

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 A01H 5/00		A1	(11) 国際公開番号 W096/38034
			(43) 国際公開日 1996年12月5日(05.12.96)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/01485 (22) 国際出願日 1996年5月31日(31.05.96) (30) 優先権データ 特願平7/133741 1995年5月31日(31.05.95) JP 特願平7/285401 1995年11月1日(01.11.95) JP 特願平8/52010 1996年3月8日(08.03.96) JP		(81) 指定国 AU, BR, CA, CN, JP, RU, US, ARIPO特許(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 麒麟麦酒株式会社(KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒104 東京都中央区新川二丁目10番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 小川俊也(OGAWA, Toshiya)[JP/JP] 吉岡正陽(YOSHIOKA, Masaharu)[JP/JP] 石田 功(ISHIDA, Isao)[JP/JP] 〒236 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟麦酒株式会社 基盤技術研究所内 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 井理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP)			
(54) Title : VIRUS-RESISTANT PLANT EXPRESSING 2',5'-OLIGOADENYLIC ACID SYNTHETASE AND RIBONUCLEASE L ORIGINATING IN ANIMAL CELLS AND PROCESS FOR CONSTRUCTING THE SAME			
(54) 発明の名称 動物細胞由来2',5'オリゴアデニル酸合成酵素及びリボヌクレアーゼLを発現するウイルス抵抗性植物及びその作製法			
(57) Abstract A process for constructing a plant resistant to an RNA virus which comprises integrating a DNA sequence encoding a 2',5'-oligoadenylic acid synthetase originating in animal cells and another DNA sequence encoding a ribonuclease L originating in animal cells into a plant chromosome followed by the expression therein, and the plant thus constructed. The present invention is applicable widely to the development of virus-resistant plant varieties.			

(57) 要約

本発明は、動物細胞由来2',5'オリゴアデニル酸合成酵素をコードするDNA配列及び動物細胞由来リボヌクレアーゼLをコードするDNA配列を植物染色体中に組み込んで発現させることにより、RNAウイルスに抵抗性を持つ植物を作出する方法、及びそれによって作出された植物に関する。

本発明は、ウイルス抵抗性植物品種の育成に広く応用できる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を固定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソト	SD	スーダン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BEE	ベルギー	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BFF	ブルガリア・ファソ	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロヴァキア
BGJ	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドバ共和国	SN	セネガル
BN	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア旧ユーゴスラ	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TG	トーゴ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IS	イスランド	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TR	トルコ
CH	イス	JP	日本	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジニコ	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノールウェー	US	アメリカ合衆国
CU	キューバ	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン			VN	ヴィエトナム

明 紹 書

動物細胞由来2',5'オリゴアデニル酸合成酵素及びリボヌクレアーゼLを発現するウイルス抵抗性植物及びその作製法

技術分野

本発明は、遺伝子組換え技術を用いて動物細胞由来2',5'オリゴアデニル酸合成酵素及びリボヌクレアーゼLを発現するウイルス抵抗性植物を作出する技術に関する。更に具体的には、本発明は、動物細胞由来2',5'オリゴアデニル酸合成酵素及びリボヌクレアーゼLをコードするDNA配列を植物染色体中に組み込んで発現させることにより、ウイルスに対して抵抗性を持つ植物を作出する方法、及びそのような方法で得られたウイルス抵抗性植物に関するものである。

背景技術

ウイルスは植物にとって大きなストレス源の一つであり、ウイルス病害によって作物の産地が移動したり、品種が更新されたりすることも稀ではない。現在のところ、ウイルスに直接作用する有効な薬剤はなく、ウイルス感染した植物は焼却処分されている。ウイルス抵抗性は育種の重要な目標であるが、野生種・近縁種の中に抵抗性遺伝子源が見つからない場合、従来の交配等による育種技術ではウイルス抵抗性品種の育成は不可能であった。

このような従来の育種技術の欠点を補う方法として、近年遺伝子組換え技術を用いて植物にウイルス抵抗性を与える方法が開発された。遺伝子組換え技術は、前記のような交配の壁を超えた遺伝子導入を可能にした。また、既存品種にウイルス抵抗性遺伝子のみを導入することができ、育種にかかる時間を大幅に短縮できるようになった。

遺伝子組換え技術を用いたウイルス抵抗性植物の作出方法としては、ウイルス外被蛋白質、ウイルス複製蛋白質をコードする遺伝子、アンチセンス遺伝子、サテライトRNAをコードする遺伝子を植物で発現させる方法等が報告されている（例えば、Arch. Virol., 115, 1, 1990）。これらの方法は、一種のウイルスあるいは近縁のウイルスに対してのみ抵抗性を与えるものであり、多種類のウイル

スに対して抵抗性を与える方法については未だ開発途上にある。

多種類のウイルスに対して同時に抵抗性を与える方法として、二本鎖RNA特異的リボヌクレアーゼを用いた方法（国際公開 WO 93/20686）、2',5'オリゴアデニル酸合成酵素を用いた方法（Bio/Technology, 11, 1048, 1993）が報告されている。

2',5'オリゴアデニル酸合成酵素遺伝子を用いた方法については、得られる形質転換植物体のウイルス抵抗性が非常に弱いという報告もされている（The proceedings of XVIIIth Eucarpia Symposium, Section Ornamentals, 1995）。即ち、2',5'オリゴアデニル酸合成酵素をタバコ植物（Samsun株）に導入し、2',5'オリゴアデニル酸合成酵素活性を発現する植物にタバコモザイクウイルス（以下「TMV」という。）OM株を接種したところ、対照と比較して病徴の発現の遅れは全く認められなかった。また、植物細胞ではリボヌクレアーゼL類似分子の存在が認められないという報告も多い（Biochem. Biophys. Res. Commun., 108, 1243, 1982; J. Biol. Chem., 259, 3482, 1984; The proceedings of XVIIIth Eucarpia Symposium, Section Ornamentals, 1995）。

発明の開示

本発明者らは、動物細胞由来の2',5'オリゴアデニル酸合成酵素遺伝子とリボヌクレアーゼL遺伝子を同時に植物体で発現させることにより2',5'オリゴアデニル酸合成酵素のみによるウイルス抵抗性よりも顕著に抵抗性が増すことを期待して鋭意研究を重ねた結果、本発明を完成した。

本発明は、動物細胞由来2',5'オリゴアデニル酸合成酵素（以下「2-5Aase」という。）をコードするDNA配列及び動物細胞由来リボヌクレアーゼL（以下「RNaseL」という。）をコードするDNA配列を植物染色体中に組み込んで発現させることにより、RNAウイルスに抵抗性を持つ植物を作出する方法、及びそのような方法で作出されたウイルス抵抗性植物に関するものである。

以下、本発明を詳細に説明する。

（1）2-5Aase 及びRNaseLをコードするDNA配列

動物細胞において、インターフェロンによって誘導される抗ウイルス状態の一

部を担っているものとして、2-5Aase/RNaseLシステムの存在が知られている(Annu. Rev. Biochem., 51, 251, 1982)。2-5Aase蛋白質は二本鎖RNAを認識して活性化され、基質であるアデノシン3'リン酸(以下「ATP」という。)より2',5'オリゴアデニル酸(通常トライマー又はテトラマーで、以下「2-5A」という。)を合成する酵素活性を持つ蛋白質をいう。2-5AaseをコードするcDNAは、ヒト(EMBO J., 4, 2249, 1985)、マウス(J. Biol. Chem., 266, 15293, 1991; Nuc. Acids. Res., 19, 1919, 1991)、ラット(EMBL Acc. No. Z18877)からクローニングされている。また、本発明者らは、今回ウシから2-5AaseをコードするcDNAをクローニングすることに成功した。2-5AaseをコードするDNA配列としては、これらのものに限らず、前記活性を有している限り本発明に用いることができる。つまり、他の動物種からクローニングしたもの、更にこれらにアミノ酸の置換、欠失、付加、挿入が加わったものであっても、前記2-5Aase活性を持つものであれば本発明に用いることができる。RNaseL蛋白質は2-5Aと結合する活性を持ち、2-5Aが結合することによりRNA分解活性を示すものをいう。RNaseLをコードするcDNAは、ヒト(Cell, 72, 753, 1993)からクローニングされている。また、本発明者らは、今回ウシからRNaseLをコードするcDNAをクローニングすることに成功した。RNaseLをコードするDNA配列としては、これらのものに限らず、他の動物種からクローニングしたもの、これらにアミノ酸の置換、欠失、付加、挿入が加わったものであっても、前記RNaseL活性を持つものであれば本発明に用いることができる。

以下に示す実施例においては、2-5Aase及びRNaseLをコードするDNA配列として、ヒト又はウシ由来のcDNAクローンを使用したが、本発明に使用し得る2-5Aase、RNaseLをコードするDNA配列は、このヒト又はウシ由来2-5Aase、RNaseLに限定されるものではないことはいうまでもない。

また、一般にあるDNA配列があるアミノ酸配列を持つポリペプチドをコードする場合、一つのアミノ酸配列に対応する遺伝コード(コドン)が複数存在するために、一つのアミノ酸配列に対応するDNA配列が複数個存在する(縮重異性体)。本発明に用いる2-5Aase、RNaseLをコードするDNA配列においても、それがコードするポリペプチドのアミノ酸配列を変化させない範囲において、任意

の遺伝コードを用いることができるることはいうまでもない。

(2) 2-5Aase 及びRNaseLをコードするDNA配列の発現

2-5Aase 及びRNaseLをコードするDNA配列が遺伝子組換え植物中で発現するためには、少なくともこのDNA配列がRNAに転写されることが必要である。植物染色体中に外来遺伝子を組み込む場合、ある確率によって染色体上の被転写領域に組み込まれることが知られている (EMBO J., 6, 3891, 1987) ので、2-5Aase 又はRNaseLをコードするDNA配列を単独に組み込んで発現させることも可能である。しかし、好ましくはあらかじめ適当なプロモーター及びターミネーター配列を連結してから組み込むことが好ましい。

この場合、プロモーターとしては、これまでに植物細胞中で機能することが知られているあらゆるプロモーター、具体的にはリブロース-1,5-2リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする遺伝子のプロモーター、ノバリン合成酵素遺伝子のプロモーター、カリフラワーモザイクウイルス35S-RNAを生じるプロモーター (CaMV 35Sプロモーター) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2358, 1986; Plant Cell Rep., 4, 355, 1985; Cell, 30, 763, 1982; Nature, 313, 810, 1985) 等を用いることができる。ターミネーターとしても、これまでに植物細胞中で機能することが知られているあらゆるターミネーターを使用することができる。具体的には、ノバリン合成酵素遺伝子のターミネーター、オクトビン合成酵素遺伝子のターミネーター (J. Mol. Appl. Gen., 1, 561, 1982; EMBO J., 3, 835, 1984) 等を利用することができる。

(3) 2-5Aase 及びRNaseLをコードするDNA配列の植物への組み込み

植物細胞に2-5Aase 又はRNaseLをコードするDNA配列を導入するには、すでに報告され確立された種々の方法、例えば *Agrobacterium tumefaciens* のTiプラスミドをベクターとして用いる方法や、植物片や植物プロトプラストに直接DNAを導入する方法等を、目的とする植物種に応じて適宜用いることができる (例えば、"Plant genetic transformation and gene expression; a laboratory manual", Draper, J. et al., Blackwell Scientific Publications, 1988)。形質転換した植物組織又は細胞を植物種に応じた適当な条件下で組織培養することにより、形質転換植物体を再生することができる。2-5Aase とRNaseL

を同時に発現する形質転換植物体を得る方法としては、2-5Aase 又はRNaseLを導入した植物体でのそれぞれ目的遺伝子の発現を調べ、それぞれの遺伝子を発現している植物体を交配する方法が考えられる。また、2-5Aase 又はRNaseLを導入した形質転換体を再度、他の遺伝子を用いて形質転換する方法、あるいは2-5Aase とRNaseLを同時に形質転換する方法も可能である。

図面の簡単な説明

図1は、ヒト由来2-5Aase 、RNaseL c DNAを含む植物形質転換ベクターを示す図である。

NOSpro ノバリン合成酵素遺伝子プロモーター

NOSTerm ノバリン合成酵素遺伝子ターミネーター

CaMV35S カリフラワーモザイクウイルス35S プロモーター

NPTII ネオマイシン耐性遺伝子

HYG ハイグロマイシン耐性遺伝子

2-5Aase 2-5Aase c DNA

RNaseL (T) 部分長RNaseL c DNA

RNaseL (F) 全長RNaseL c DNA

RB 右ボーダー

LB 左ボーダー

図2は、2-5Aase 導入形質転換タバコ（キサンチnc株）の葉中の2-5Aase の活性を示す図である。

control 非形質転換体

2-5Aase#11b 形質転換体

2-5Aase#12a 形質転換体

2-5Aase#13b 形質転換体

図3は、部分長RNaseL導入形質転換タバコ（キサンチnc株）の葉中のRNaseLの活性を示す図である。

control 非形質転換体

RNaseL#H1 形質転換体

RNaseL#H2 形質転換体

RNaseL#H3 形質転換体

RNaseL#H4 形質転換体

Spleen マウス脾臓粗抽出液

図4は、全長RNaseL導入形質転換体タバコ（キサンチnc株）の葉中のRNaseLの活性を示す図である。

control 非形質転換体

RNaseL (F) #23a 形質転換体

RNaseL (F) #14a 形質転換体

RNaseL (F) #27a 形質転換体

RNaseL (F) #12b 形質転換体

RNaseL (F) #30b 形質転換体

Spleen マウス脾臓粗抽出液

図5は、CMV (Y株) 接種後の2-5Aase導入タバコ (2-5Aase#11b) と2-5Aase+部分長RNaseL導入タバコ (2-5Aase#11b+RNaseL#H1, 2-5Aase#11b+RNaseL#H4) の非接種上葉に病徵が見られた植物体の割合(%)を示す図である。

図6は、CMV (Y株) 接種タバコ葉中のCMV 外被蛋白質の検出のための電気泳動の結果を示す写真である。

2-5Aase#11b 2-5Aase 導入タバコ

2-5Aase#11b+RNaseL#H4 2-5Aase+部分長RNaseL導入タバコ

図7は、CMV Y 株感染3日後における2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコ、2-5Aase 導入タバコ及びRNaseL (F) 導入タバコの壞死斑の有無を表す生物の形態を示す写真である。

A 2-5Aase#13b

B 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a

C RNaseL (F) #23a

D 2-5Aase#13b

E 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a

F RNaseL (F) #27a

G 2-5Aase#13b

H 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b

I RNaseL (F) #30b

↑ 接種葉

図8は、CMV Y株感染12日後における2-5Aase+RNaseL (F)導入タバコ、2-5Aase導入タバコ及びRNaseL (F)導入タバコの全身病徴の有無を表す生物の形態を示す写真である。

A 2-5Aase#13b

B 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a

C RNaseL (F) #23a

D 2-5Aase#13b

E 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a

F RNaseL (F) #27a

G 2-5Aase#13b

H 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b

I RNaseL (F) #30b

図9は、各形質転換タバコの感染5日後の接種葉の壊死斑部分と同一の葉で壊死斑を形成していない部分におけるCMVの検出のための電気泳動の結果を示す写真である。

1 2-5Aase#13b

2 RNaseL (F) #23a

3 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a 壊死斑形成部分

4 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a 壊死斑のない部分

5 RNaseL (F) #30b

6 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b 壊死斑形成部分

7 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b 壊死斑のない部分

8 RNaseL (F) #27a

9 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a 壊死斑形成部分

10 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a 壊死斑のない部分

図10は、各形質転換タバコの感染12日後の非接種上葉におけるCMVの検出のための電気泳動の結果を示す写真である。

- 1 非形質転換体
- 2 2-5Aase#13b
- 3 RNaseL (F) #23a
- 4, 5 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a
- 6 RNaseL (F) #27a
- 7, 8 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a
- 9 RNaseL (F) #30b
- 10, 11 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b

図11は、CMV Y 株感染葉粗汁液の接種5日後における2-5Aase+RNaseL (F)導入タバコ、2-5Aase導入タバコ及びRNaseL (F)導入タバコの壊死斑の有無を表す生物の形態を示す写真である。

- A 2-5Aase#13b
- B 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a
- C RNaseL (F) #23a
- D 2-5Aase#13b
- E 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b
- F RNaseL (F) #30b

↑ 接種葉

図12は、CMV Y 株感染葉粗汁液の接種16日後における2-5Aase+RNaseL (F)導入タバコ、2-5Aase導入タバコ及びRNaseL (F)導入タバコの全身病徵の有無を表す生物の形態を示す写真である。

- A 2-5Aase#13b
- B 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a
- C RNaseL (F) #23a
- D 2-5Aase#13b
- E 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b
- F RNaseL (F) #30b

図13は、PVY T株感染葉粗汁液の接種5日後における2-5Aase+RNaseL (F)導入タバコ、2-5Aase導入タバコ及びRNaseL (F)導入タバコの壊死斑の有無を表す生物の形態を示す写真である。

- A 2-5Aase#13b
- B 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a
- C RNaseL (F) #23a
- D 2-5Aase#13b
- E 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b
- F RNaseL (F) #30b

↑ 接種葉

図14は、PVY T株感染葉粗汁液の接種14日後における2-5Aase+RNaseL (F)導入タバコ、2-5Aase導入タバコ及びRNaseL (F)導入タバコの全身病徴の有無を表す生物の形態を示す写真である。

- A 2-5Aase#13b
- B 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a
- C RNaseL (F) #23a
- D 2-5Aase#13b
- E 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a
- F RNaseL (F) #27a
- G 2-5Aase#13b
- H 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b
- I RNaseL (F) #30b

図15は、各形質転換タバコの感染5日後の非接種上葉(A)及び感染10日後の非接種上葉(B)におけるPVY T株の検出のための電気泳動の結果を示す写真である。

- 1 非形質転換体
- 2, 3 2-5Aase#13b
- 4, 5 RNaseL (F) #23a
- 6, 7 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a

8, 9 RNaseL (F) #30b

10, 11 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b

図16は、PVY 0 株感染葉粗汁液の接種3日後における2-5Aase+RNaseL (F)導入タバコ、2-5Aase導入タバコ及びRNaseL (F)導入タバコの壞死斑の有無を表す生物の形態を示す写真である。

A 2-5Aase#13b

B 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a

C RNaseL (F) #23a

D 2-5Aase#13b

E 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a

F RNaseL (F) #27a

G 2-5Aase#13b

H 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b

I RNaseL (F) #30b

↑ 接種葉

図17は、PVY 0 株感染葉粗汁液の接種15日後における2-5Aase+RNaseL (F)導入タバコ、2-5Aase導入タバコ及びRNaseL (F)導入タバコの全身病徵の有無を表す生物の形態を示す写真である。

A 2-5Aase#13b

B 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a

C RNaseL (F) #23a

D 2-5Aase#13b

E 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a

F RNaseL (F) #27a

G 2-5Aase#13b

H 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b

I RNaseL (F) #30b

図18は、各形質転換タバコの感染5日後の接種葉（A）及び感染6日後の非接種上葉（B）におけるPVY 0 株の検出のための電気泳動の結果を示す写真であ

る。

- 1 非形質転換体
- 2 2-5Aase#13b
- 3 RNaseL (F) #23a
- 4, 5 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a
- 6 RNaseL (F) #27a
- 7, 8 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a
- 9 RNaseL (F) #30b
- 10, 11 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b

図19は、ウシ2-5Aase cDNAの塩基配列とそれから予測されるアミノ酸配列を示す図である。

図20は、ウシRNaseLcDNAの塩基配列とそれから予測されるアミノ酸配列を示す図である。

図21は、2-5Aase導入形質転換タバコ（サムソン）の葉中の2-5Aaseの活性を示す図である。

control 非形質転換体

- #13-4 2-5Aase導入形質転換体
- #13-5 2-5Aase導入形質転換体
- #13-7 2-5Aase導入形質転換体
- #13-9 2-5Aase導入形質転換体
- #13-10 2-5Aase導入形質転換体
- #13-11 2-5Aase導入形質転換体

図22は、RNaseL(F)導入形質転換タバコ（サムソン）の葉中のRNaseL活性を示す図である。

control 非形質転換体

- #57-4a RNaseL(F)導入形質転換体
- #57-6b RNaseL(F)導入形質転換体
- #57-11 RNaseL(F)導入形質転換体
- #58-7 RNaseL(F)導入形質転換体

#58-11 RNaseL (F) 導入形質転換体

#58-18 RNaseL (F) 導入形質転換体

図23は、CMV Y 株感染葉粗汁液の接種3日後における2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコ、2-5Aase 導入タバコ及びRNaseL (F) 導入タバコの壊死斑の有無を表す生物の形態を示す写真である。

A 2-5Aase (S) #13-10

B 2-5Aase (S) #13-10+RNaseL (S) #57-6b

C RNaseL (S) #57-6b

↑ 接種葉

図24は、CMV Y 株感染葉粗汁液の接種10日後における2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコ、2-5Aase 導入タバコ及びRNaseL (F) 導入タバコの全身病徵の有無を表す生物の形態を示す写真である。

A 2-5Aase (S) #13-10

B 2-5Aase (S) #13-10+RNaseL (S) #57-6b

C RNaseL (S) #57-6b

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げて更に具体的に本発明を説明するが、本発明の範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

以下の実施例では、2-5Aase 及びRNaseLのDNA配列としてヒト由来のcDNAを使用し、植物でこの遺伝子を発現させるためのプロモーターとしてはCaMV 35Sプロモーターを使用した。2-5Aase cDNAの発現には、pBI121ベクター (EMBO J., 6, 3901, 1987) 上のβグルクロニダーゼ遺伝子 (βGUS) と2-5Aase cDNAを入れ替えて使用した。RNaseLcDNAの発現には、pBIB-HYGベクター (ケルン大学遺伝研究所、Dr. Detlef Becker より入手) へ、CaMV 35SプロモーターをRNaseLcDNAの5'上流につなげたDNA配列を導入したものを使用した。

本発明の効果を確認するための宿主植物としてタバコ (キサンチnc株) を使用し、アグロバクテリウムを介してリーフディスク法によるか、又はタバコプロト

プラストを用いてエレクトロポレーション法によってタバコ形質転換体を得た (Plant genetic transformation and gene expression; a laboratory manual, Draper, J. et al., Blackwell Scientific Publications, 1988)。

形質転換体中の2-5Aase c DNA及びRNaseLc DNA発現の有無は、形質転換体植物の葉から粗抽出液を調製し、それぞれ2-5Aase活性 (J. Biol. Chem., 259, 1363, 1984)、RNaseL活性 (Anal. Biochem., 144, 450, 1985) を測定することによって調べた。

2-5Aase c DNAとRNaseLc DNAを同時に発現している形質転換体タバコは、2-5Aase活性を発現しているタバコ植物とRNaseL活性を発現しているタバコ植物を交配することによって得た。2-5Aaseのみを発現しているタバコ植物、2-5AaseとRNaseLの両方を発現しているタバコ植物にキュウリモザイクウイルス (CMV Y株) を感染させたところ、2-5Aaseのみを発現しているタバコ植物に比較して有意に高いウイルス抵抗性を示した。

(実施例1) 形質転換植物作製に用いるプラスミドの作製 (図1)

報文 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4904, 1983) に記載されているヒト由来2-5AaseのDNA配列 (配列番号1) を基に、c DNAクローニングのためのプローブ (配列番号2) を作製した。c DNAクローニングのためのライブラリーは、HeLa細胞 (東京大学薬学部生理化学教室、榎本助教授より入手) を200units/ml のヒトβインターフェロン (Paesel Lorei GMBH & CO, Frankfurt) で12時間処理した後、mRNAを抽出し、ファルマシアc DNA合成キットを用いてc DNAを作製し、Lambda gt10ベクターにつなげて作製した。2-5Aase mRNAは2種 (1.6kbと1.8kb) あることが報告されているが、植物発現用には1.6kb mRNAに対するc DNAを用いた。2-5Aase c DNA (EcoRI断片) をpBI121のβGUSに入れ替え、植物発現用プラスミドpBI2-5Aaseを作製した。

ヒト由来RNaseLc DNAについては、報文 (Cell, 72, 753, 1993) に記載されているDNA配列 (配列番号3) を基にプローブ (配列番号4) を作製し、ヒト脾臓c DNAライブラリー (Clontech社) をスクリーニングすることによって取得した。ヒト脾臓c DNAライブラリーから2種、部分長 (C末端アミノ酸61残基欠いているもの) と全長のc DNAクローニングを得た。2種のRNaseLc DNA

(HindIII-EcoRI 断片) のN末端側にCaMV 35Sプロモーターをつなげ、これをpBIB-HYGベクターのHindIII-SacI断片に入れ替え、植物発現用プラスミドを作製した。部分長RNaseLを含むもの、全長RNaseLを含むものを、それぞれpBIBRNaseL (T) 、pBIBRNaseL (F) という。

(実施例2) タバコ植物の形質転換

形質転換には、タバコ (*Nicotiana tabacum*) キサンチnc株 (*Xanthi nc*) を用いた。図1に示したプラスミドpBI2-5Aase又はpBIBRNaseL (F) をそれぞれ、エレクトロポレーション法によりアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 株に導入した。リーフディスク法によりタバコ葉片にアグロバクテリウムを感染させ、250 μ g/mlクラフォラン、100 μ g/mlカナマイシン又は20 μ g/mlハイグロマイシン入りMS-B5 培地 [Murashige & Skoog 基本培地 (Physiol. Plant., 15, 473, 1962) にB5ビタミンを添加したもの] 上に置床して形質転換体を選択した。シートが出てきたら、ホルモンフリーのMS培地に移し発根させた。得られた形質転換植物体は、プラントボックスにて無菌インピトロカルチャーした後、鉢上げして自家受粉又は交配 (2-5Aase + RNaseL) してR1種子を得た。

プラスミドpBIBRNaseL (T) は、タバコ葉より調製したプロトプラスト細胞へエレクトロポレーションによって導入された。プロトプラストは、タバコ (キサンチnc株) 葉肉細胞から酵素液 [1%Cellulase Onozuka RS (ヤクルト社) , 1%Driselase (協和発酵工業社) , 0.1%Pectolyase (Seihshin Pharmaceutical社) , 0.4M D-マンニトール (pH5.7)] により室温で一晩処理して調製した。冷0.4MD-マンニトールでプロトプラストを3回洗浄して、 1×10^8 個の細胞を約10 μ g のDNAプラスミドを含む0.8ml のエレクトロポレーションバッファー (0.3MD-マンニトール, 5mM 2-(N-モルホリノ) エタンスルホン酸 pH5.8, 70mM KCl) に懸濁し、エレクトロポレーションキュベット (Bio-rad社、0.4cm 幅) に移して、125 μ F, 300V で加電した。エレクトロポレーションしたプロトプラストは、1%アガロースを含むスフェロプラスト培地 (1%スクロース, 0.4MD-マンニトール, 0.2 μ g/ml 2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸を含む Murashige & Skoog 培地) 中で1週間、28°C、暗黒下で培養し、次にハイグロマ

イシン (20 μ g/ml) による形質転換体の選択を行った。得られたコロニーからシートが形成された後、ホルモンフリー培地に移して形質転換植物体を得た。得られた形質転換植物体は、プラントボックスにて無菌インビトロカルチャーした後、鉢上げし、2-5Aase 植物と交配して F 1 種子を得た。

(実施例3) 2-5Aase 導入形質転換タバコ中の2-5Aase 活性の検出 (図2)

インビトロカルチャーしたタバコ葉、インターフェロン処理したHeLa細胞からの粗抽出液をWells らの方法 (J. Biol. Chem., 259, 1363, 1984) によって調製した。葉の湿重量を測定し、液体窒素中で粉碎し、等量の溶解バッファー (0.5% Nonidet P-40, 90mM KCl, 1mM酢酸マグネシウム, 10mM Hepes pH7.6, 2mM 2-メルカプトエタノール, 20 μ g/mlロイペプチド, 50 μ g/mlウシ肺アプロチニン (bovine lung aprotinin), 50 μ M フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF), 50 μ g/mlトリプシン阻害剤) を加え、テフロンベッスルホモジナイザーによってホモジナイズし、15,000rpm, 4°C, 20min で2回遠心して上清を取った。葉粗抽出液1ml (HeLa細胞粗抽出液の場合は、粗抽出液を溶解バッファーで10倍に希釈したもの) に40 μ l のpolyI:polyC セルロース懸濁液を加えて、4°C で2時間反応させた後、洗浄バッファー (20mM Hepes pH7.0, 10mM酢酸マグネシウム, 5mM KCl) で3回遠心洗浄して 0.2 μ l 32 P-rATP (10mCi/ml, 3000Ci/mmol, NEN社) を含む反応混合物 (20mM Hepes pH7.0, 20% グリセリン, 7mM 2-メルカプトエタノール, 2mM ATP, 5mM KCl, 10mM 酢酸マグネシウム) 50 μ l に懸濁し、30°Cで一晩 (16~20時間) 反応させた。反応液中に生成された 32 P 標識オリゴアデニル酸は、Wells らの方法 (J. Biol. Chem., 259, 1363, 1984) に従ってDEAEセルロースを用いて精製して液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。polyI:polyC セルロースは、Wells らの方法 (J. Biol. Chem., 259, 1363, 1984) によって作製した。粗抽出液中の蛋白量はBio-rad 社のプロテインアッセイキットによって測定した。

非形質転換体の値に対して、2-5Aase 形質転換タバコは有意に高い活性を示した。また、HeLa細胞粗抽出液では、219nmol/mg蛋白質/4h であり、2-5Aase タバコに比べ非常に高い活性であった。

(実施例4) RNaseL導入形質転換タバコ中のRNaseL活性の検出 (図3、図4)

インピトロカルチャードしたタバコ葉、マウス脾臓からの抽出液をSilverman らの方法 (J. Biol. Chem., 263, 7336, 1988) によって調製した。葉の湿重量を測定し、液体窒素中で粉碎した後、等量のハイポバッファー (0.5% Nonidet P-40, 20mM Hepes pH7.6, 10mM酢酸カリウム, 15mM酢酸マグネシウム, 1mM ジチオトレイトール (DTT), 100 μ M PMSF, 20 μ g/mlロイペプチド) を加えてポリトロンによってホモジナイズした。ホモジネートを15,000rpm, 4°C, 20min で2回遠心して上清を取り粗抽出液とした。2-5A (5'-3リン酸テトラマー、生化学工業社) 及びコントロール (ATP) セルロースは、polyI:polyC セルロースと同様な方法 (実施例3参照) で調製した。1.0ml タバコ葉 (全長RNaseLタバコの場合は0.5ml) 、マウス脾臓抽出液 (マウス脾臓抽出液はハイポバッファーで4倍に希釈されたもの) に2.5 μ l の0.1M ATP、7.5 μ l の3M KClを加え、25 μ l ATPセルロース懸濁液と混ぜ、4°Cで1時間反応させた後、遠心し上清を取り25 μ l 2-5Aase セルロース懸濁液を加え、4°Cで2時間反応させ上清を捨てた。反応させた後、遠心して沈殿させたATPセルロース、2-5Aase セルロースは、バッファーA (11.5mM Hepes pH7.6, 104mM KCl, 5.8mM酢酸マグネシウム, 8.8mM 2-メルカプトエタノール, 10 μ M PMSF, 20 μ g/mlロイペプチド) で3回遠心洗浄した後、50 μ l バッファーAで懸濁した。 32 P ラベル化polyU 基質をSilverman の方法 (Anal. Biochem., 144, 450, 1985) に従って調製した。20 μ l の懸濁液と20 μ l の反応液 (4 μ l の 100 μ M 2-5A, 2 μ l の5×バッファーA, 0.25 μ l の 32 P-polyUpCp, 0.05 μ l の10 μ M cold polyU, 13.7 μ l の水) を混ぜ、37°Cで一晩 (16時間) 反応させた後、50 μ l の10mg/ml 酵母RNA、1ml トリクロロ酢酸 (TCA) を加え反応を停止させた。氷上で15min 以上放置した後、Whatman GF/Cフィルター上にTCA-不溶性画分をトラップして、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。2-5A依存的RNase 活性 (RNaseL活性) は、ATPセルロース画分の放射活性から2-5Aセルロース画分の放射活性を引いたものとして表した。粗抽出液中の蛋白量はBio-rad 社のプロテインアッセイキットによって測定した。非形質転換タバコの値は0以下の値を示したのに対して、部分長RNaseL形質転換タバコでは+の値を示した (図3)。全長RNaseL形質転換タバコでは、部分長RNaseLよりも更に高い活性を示した (図4)。

(実施例5) キュウリモザイクウイルス (CMV Y 株) 感染実験 (図5、図6)

R1種子 (2-5Aase 導入タバコ、2-5Aase+RNaseL(T) 導入タバコ) を $800 \mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシン又は $800 \mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシン+ $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ハイグロマイシンを含む MS寒天培地上に播種し、2-5Aase 導入タバコ植物体、2-5Aase + RNaseL導入植物体を選択した。幼植物は鉢上げした後、葉の一部からDNAを抽出 (Nuc. Acids Res., 21, 4153, 1993) してPCR によって2-5Aase 又はRNaseL c DNAの存在を確認した。鉢上げした後、約2週間経過した植物体にCMV Y 株 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ を接種し、ウイルス感染後の病徴の出現を観察した。各形質転換体について、5個体を用いた。感染後、非接種上葉に病徴が現われた植物の割合を%で示した。活性を確認した部分長RNaseLタバコ (実施例3、図3参照) と2-5Aase タバコを交配して得た2-5Aase+ RNaseL (T) 導入タバコは、2-5Aase のみを導入した形質転換タバコに対して、有意に強いウイルス抵抗性を示した (図5)。感染8日後の形質転換タバコ (2-5Aase#11b, 2-5Aase#11b+RNaseL#H4) の非接種上葉を各形質転換体、5個体ずつから切り取り、5倍量のSDS バッファー (2%SDS, 80mM Tris-HCl pH6.8, 2%2-メルカブトエタノール, 10% グリセリン) で全蛋白質を抽出し、各サンプルをSDS 電気泳動用サンプルバッファーで100倍に希釈して、 $10 \mu\text{l}$ をSDS ポリアクリルアミド電気泳動で分画した。ポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜 (ミリポア社) へ蛋白質を転写して、抗CMV ウサギ血清 (約2000倍希釈) とプロテインA-アルカリホスファターゼ発色により感染植物葉中のCMV を検出した。2-5Aase#11b タバコの非接種上葉では、強いCMV 菲積がサンプリングした5個体全てに見られたのに対して、2-5Aase#11b+RNaseL#H4 タバコでは、5個体中で2個体にのみしか見られなかった (図6)。

(実施例6) キュウリモザイクウイルス (CMV Y 株) 感染実験

R1種子 (2-5Aase 導入タバコ、1系統 (2-5Aase#13b) ; RNaseL(F) 導入タバコ、3系統 (RNaseL (F) #23a、RNaseL (F) #27a、RNaseL (F) #30b))、F1種子 (2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコ、3系統 (2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a、2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a、2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b)) を $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ハイグロマイシンを含むMS寒天培地上に播種し、RNaseL (F) 導入植物体を選抜した。幼植物は鉢上げした後、葉の一部からDNAを抽出してPCR によって

2-5Aase 又はRNaseL (F) c DNA の存在を確認した（実施例 5 参照）。鉢上げした後、約 4 週間経過した植物体に CMV Y 株 $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ を接種し、ウイルス感染後の経過、病徵の出現を観察した。各形質転換体の系統について 5 個体を接種実験に供した。その結果、感染 3 日後に、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコの、すべての系統、すべての個体の接種葉に 壊死斑が観察された。一方、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコでは 壊死斑は観察されなかった（図 7）。更に、感染後 12 日目では、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコでは、すべての系統、すべての個体で 非接種上葉で 病徵が観察されたが、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコにおいては、すべての系統、すべての個体の 非接種上葉で 病徵は観察されなかった（図 8）。各形質転換タバコの感染 5 日後の接種葉の 壊死斑部分と同一の葉で 壊死斑を形成していない部分、及び感染 12 日後の非接種上葉より、実施例 5 で示した方法で全蛋白質を抽出し、感染植物葉中の CMV を検出した。その結果、感染 5 日後の接種葉では、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコでは 大量の CMV が蓄積されている一方、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコにおいては、 壊死斑部分において 少量の CMV が検出されたものの、 壊死斑を形成していない部分では CMV は検出されなかった（図 9）。また、感染 12 日後の非接種上葉においても、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコでは 大量の CMV が蓄積されている一方、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコにおいては、CMV は全く検出されなかった（図 10）。これらのことから、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコにおいては、接種葉において CMV 感染によって 壊死斑を形成し、感染された細胞が 壊死し、それによってウイルスが広がるのを防ぎ、結果として全く病徵が現われなかつたと考えられる。

（実施例 7）接種源としてウイルス感染植物葉粗汁液を用いたキュウリモザイクウイルス（CMV Y 株）感染実験

R1種子（2-5Aase 導入タバコ、1 系統（2-5Aase#13b）；RNaseL (F) 導入タバコ、2 系統（RNaseL (F) #23a、RNaseL (F) #30b））、F1種子（2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコ、2 系統（2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a、2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b））を用いて、実施例 6 で示した方法で植物体を育成した。鉢上げした後、約 2 週間経過した植物体に CMV Y 株を感染させ 病徵を呈したタバコ

葉 (Xanthi nc 株) を、葉の重量あたり10倍量の抽出緩衝液 (10mMリン酸緩衝液 (pH7.0)、20mM2-メルカプトエタノール) で摩碎し、その粗汁液を鉢上げした後約2週間経過した植物体に接種し、接種後の経過、病徵の出現を観察した。各形質転換体の系統について2個体を接種実験に供した。その結果、実施例6で示した、15μg/mlの純化ウイルスを接種した際と同様の経過が観察された。つまり、接種3日後に、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコの、すべての系統、すべての個体の接種葉に壞死斑が観察された。一方、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコでは壞死斑は観察されなかった。接種5日後の接種葉を図11に示した。更に、感染12日後では、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコでは、すべての系統、すべての個体で非接種上葉で病徵が観察されたが、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコにおいては、すべての系統、すべての個体の非接種上葉で病徵は観察されなかった。接種16日後の植物体を図12に示した。このことは、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコのCMV Y 株に対する抵抗性反応は、接種源の形状 (純化ウイルス、感染葉粗汁液) によって相違しないことを示す。

(実施例8) ポテトウイルス Y T株 (PVY T 株) 感染実験

R1種子 (2-5Aase 導入タバコ、1系統 (2-5Aase#13b) ; RNaseL (F) 導入タバコ、3系統 (RNaseL (F) #23a、RNaseL (F) #27a、RNaseL (F) #30b))、F1種子 (2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコ、3系統 (2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a、2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a、2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b)) を用いて、実施例6で示した方法で植物体を育成した。鉢上げした後、約2週間経過した植物体にPVY T 株を感染させ病徵を呈したタバコ葉 (Samsun株) を、葉の重量あたり10倍量の抽出緩衝液 (10mMリン酸緩衝液 (pH7.0)、20mM2-メルカプトエタノール) で摩碎し、その粗汁液を鉢上げした後約2週間経過した植物体に接種し、接種後の経過、病徵の出現を観察した。各形質転換体の系統について5から7個体を接種実験に供した。その結果、CMV Y 株を接種した際と同様に、接種3日後に、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコの、すべての系統、すべての個体の接種葉に壞死斑が観察された。一方、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコでは壞死斑は観察されなかった。接種5日後の接種葉を図13に示した。更に、接種5日後に、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコの、すべての系統、すべての個体

の非接種上葉に壞疽が形成され始めた。その壞疽は徐々に広がり、接種20日後には、ほぼ完全に枯死した。接種14日後における植物体を図14に示した。一方、2-5Aase導入タバコ、RNaseL (F)導入タバコでは枯死することなく、PVY T株特有の病徴を呈した。

各形質転換タバコの接種5日後及び接種10日後の非接種上葉より、実施例5で示した方法で全蛋白質を抽出し、PVY T株の蓄積を検出した。その結果、接種5日後及び接種10日後の非接種上葉いずれの場合も2-5Aase導入タバコ、RNaseL (F)導入タバコではPVY T株が蓄積されている一方、2-5Aase+RNaseL (F)導入タバコにおいては、PVY T株の蓄積は検出されなかった(図15)。これらのことから、2-5Aase+RNaseL (F)導入タバコにおいては、接種葉においてPVY T株感染によって壞死斑を形成し、感染された細胞が壞死するものの、何らかの原因で非接種上葉でもRNaseLが活性化され、全身枯死が引き起こされたと考えられる。しかし、壞疽が出現しはじめた接種5日後と壞疽が進行してきた接種10日後の非接種上葉においてもPVY T株の蓄積が検出されなかったことは、全身枯死の直接の原因がPVY T株の過剰蓄積によるものではないことを示している。実際の現場では、ウイルス感染植物は周囲の植物にウイルスを広げる(二次感染)ことを避けるために早期に処分することが行われている。2-5Aase+RNaseL (F)導入タバコが、PVY T株感染によってウイルスを蓄積する過程を経ずに枯死することは、2-5Aase+RNaseL (F)導入植物は、たとえPVY T株が感染しても二次感染源にはならず、自然に枯死することによって実栽培の際の省力が期待できる。

(実施例9) ポテトウイルス Y 0株 (PVY 0株) 感染実験

R1種子(2-5Aase導入タバコ、1系統(2-5Aase#13b) ; RNaseL (F)導入タバコ、3系統(RNaseL (F) #23a、RNaseL (F) #27a、RNaseL (F) #30b))、F1種子(2-5Aase+RNaseL (F)導入タバコ、3系統(2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a、2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a、2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b))を用いて、実施例6で示した方法で植物体を育成した。鉢上げした後、約2週間経過した植物体にPVY 0株を感染させ病徴を呈したタバコ葉(Samsun株)を、葉の重量あたり10倍量の抽出緩衝液(10mMリン酸緩衝液(pH7.0)、20mM2-メルカプトエタノール)で摩碎し、その粗汁液を鉢上げした後約2週間経過した植物体に接種

し、接種後の経過、病徵の出現を観察した。各形質転換体の系統について5個体を接種実験に供した。その結果、PVY T 株を接種した際とほぼ同様な結果が観察された。つまり、接種3日後に、2-5Aase+RNaseL (F)導入タバコの、すべての系統、すべての個体の接種葉に壞死斑が観察された。一方、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F)導入タバコでは壞死斑は観察されなかった(図16)。更に、接種5日後に2-5Aase+RNaseL (F)導入タバコの、すべての系統、すべての個体の非接種上葉に壞疽が形成され始めた。その壞疽は徐々に広がり、接種20日後には、ほぼ完全に枯死した。接種15日後の植物体を図17に示した。一方、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F)導入タバコでは枯死することなく、PVY 0 株特有の病徵を呈した。

各形質転換タバコの接種5日後の接種葉と6日後の非接種上葉より、実施例5で示した方法で全蛋白質を抽出し、感染植物葉中のPVY 0 株を検出した。その結果、接種5日後の接種葉と6日後の非接種上葉とともに、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F)導入タバコではPVY 0 株が蓄積されている一方、2-5Aase+RNaseL (F)導入タバコにおいては、PVY 0 株の蓄積は検出されなかった(図18)。これらのことから、PVY 0 株接種に対しても、2-5Aase+RNaseL (F)導入タバコは、接種葉においてPVY 感染によって壞死斑を形成し、感染された細胞が壞死するものの、ウイルスを蓄積する過程を経ずに枯死することが解かった。このことは、2-5Aase+RNaseL (F)導入タバコがウイルス感染によって枯死する性質は、PVY の株によって相違するものではなく、PVY そのものに対する反応であると考えられる。2-5Aase+RNaseL (F)導入タバコは、PVY 0 株の感染に対してもPVY T 株感染に対するのと同様に栽培の際の省力が期待でき、かつ二次感染源にはならないと考えられる。

(実施例10) 緩衝液

接種F1種子(2-5Aase+RNaseL (F)導入タバコ、3系統(2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a、2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a、2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b))を用いて、実施例6で示した方法で植物体を育成した。鉢上げした後、約2週間経過した植物体に抽出緩衝液(10mMリン酸緩衝液(pH7.0)、20mM2-メルカプトエタノール)を接種し、接種後の経過、病徵の出現を観察した。各形質転換体の

系統について2個体を接種実験に供した。その結果、接種10日後においても接種葉、非接種葉とともに変化は観察されなかった。

このことは、前記した一連の2-5Aase+RNaseL (F)導入タバコのウイルス接種後の反応は、まさにウイルスによって引き起こされており、緩衝液成分や接種そのものの行為によって引き起こされたのではないことを示す。

(実施例11) ウシ由来2-5Aase、ウシ由来RNaseLc DNAのクローニングとその塩基配列の決定

ウシ脾臓由来ファージlambda gt10 c DNAライブラリー (Clontech社) より、石田らの方法 (遺伝子発現実験マニュアル第2章、1994年講談社刊) によりファージDNAを抽出してPCRのDNAテンプレートとして用いた。ウシ2-5Aase、RNaseLc DNA断片のPCRクローニングのプライマーは、ヒト2-5Aase c DNA (EMBO J., 4, 2249, 1985)、ヒトRNaseLc DNA (Cell, 72, 753, 1993) の塩基配列を参考にして以下のようにデザインした。

ウシ2-5Aase : 5'-TCCAAGGTGGTAAAGGGTGGCTCCTCAGGCAA-3'

5'-CTCTTGGAGCTTGGTGGGGCGCTGCTTCAGGAA-3'

ウシRNaseL : 5'-CTGGGGTTCTATGAGAAGCAAGAAGTAGCTGTGAA-3'

5'-GACAAGTGTAGTTCTTGAACAGCCTTAAATATAGA-3'

石田らの方法によってPCR反応を行い、増幅されたDNA断片をpBluescript SKII⁺ プラスミド (Stratagene社) へサブクローニングした (遺伝子発現実験マニュアル第2章、1994年講談社刊)。これらのPCR増幅DNA断片 (2-5Aase : 455bp、RNaseL : 292bp) の塩基配列を決定し、それらとヒト2-5Aase、RNaseLの塩基配列をそれぞれ比較したところ、相同性 [2-5Aase : 80%、RNaseL : 73% (プライマーの配列部分は計算から除いた)] が認められた。よって、これらのPCR増幅DNA断片はそれぞれ、ウシ由来2-5Aase、RNaseLc DNAの一部であることが確認された。

ここで得られたPCR増幅DNA断片をプローブに用いて、ウシ脾臓由来c DNAファージライブラリーをスクリーニングして2-5Aase、RNaseLc DNA全長をコードするファージクローンを単離した。単離されたファージクローンからDNAを抽出して、c DNAインサートをpBluescript SKII⁺ プラスミドへサ

ブクローニングし、アプライドバイオシステムズ社DNAシークエンサー373Aを使用し、蛍光ダイターミネーター法によりDNA塩基配列を決定し、それから予測されるアミノ酸配列を明らかにした(図19:ウシ2-5Aase cDNA、図20:ウシRNaseL cDNA)。その結果、ウシ2-5Aaseは、ヒト2-5AaseE18(EMBO J., 4, 2249, 1985)、マウス2-5AaseL3(Virology, 179, 228, 1990)と相同意を持つことがわかった。

ここに得られたウシ2-5Aase、ウシRNaseL cDNAを植物で発現させることによって、ウィルス抵抗性植物の育種が可能となる。

(実施例12) タバコ植物サムソン(*Nicotiana tabacum* cv Samsun)の形質転換

形質転換には、タバコ植物サムソン(N遺伝子の表現系としてnn)を用いた。実施例2で示した方法、つまりpBI2-5Aase又はpBIRRNaseL(F)をそれぞれ導入したアグロバクテリウムLBA4404によって形質転換体を作出した(2-5Aase(S)タバコ、RNaseL(S)タバコ)。得られた形質転換体を鉢上げし、自家受粉によってR1種子を、また交配によってF1種子(2-5Aase(S)+RNaseL(S)タバコ)を得た。

(実施例13) 2-5Aase導入形質転換タバコ(サムソン)及びRNaseL(F)導入形質転換タバコ(サムソン)中の2-5Aase及びRNaseL活性の検出

2-5Aase活性の検出は実施例3で示した方法で、また、RNaseL活性の検出は実施例4で示した方法によって行った。その結果を図21及び22に示した。その結果、2-5Aase(S)タバコ中の2-5Aase活性、及びRNaseL(S)タバコ中のRNaseL活性はともに非形質転換体に比べて有意に高い値を示した。

(実施例14) サムソン形質転換体への、接種源としてウイルス感染植物葉粗汁液を用いたキュウリモザイクウイルス(CMV Y株)感染実験

R1種子(2-5Aase導入タバコ(2-5Aase(S) #13-10)、RNaseL(F)導入タバコ(RNaseL(S) #57-6b))、F1種子(2-5Aase+RNaseL(F)導入タバコ(2-5Aase(S) #13-10+RNaseL(S) #57-6b))を用いて、実施例6で示した方法で植物体を育成した。鉢上げした後、約2週間経過した植物体に、実施例7で示した方法でCMV Y株の感染植物粗汁液を接種し、接種後の経過、病徵の出現を観察した。各形質転換体の系統について3個体を接種実験に供した。その結果、実施例6、7

で示した、キサンチ (N 遺伝子の表現系としてNN) 形質転換体にCMV Y 株を接種した際と同様な経過が観察された。つまり、接種3日後に、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコの、すべての系統、すべての個体の接種葉に壞死斑が観察された。一方、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコでは壞死斑は観察されなかった (図23)。更に、感染10日後では、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコでは、すべての系統、すべての個体で非接種上葉で病徵が観察されたが、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコにおいては、すべての系統、すべての個体の非接種上葉で病徵は観察されなかった (図24)。このことは、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコのCMV Y 株に対する抵抗性反応は、宿主に用いたタバコのN遺伝子の表現系によらないことを示す。

産業上の利用の可能性

2-5Aase/RNaseLシステムは、ウイルスが細胞に感染したときに產生される二本鎖RNAを認識して細胞質でリボヌクレアーゼ活性を発現し、ウイルス増殖を抑制する。一般にRNAウイルスは、複製の段階で二本鎖RNAを形成するため、本システムは全てのRNAウイルスに対して有効である。

よって、本発明で示した遺伝子組換えにより2-5Aase とRNaseLを導入するウイルス抵抗性植物の作出技術は、ウイルス抵抗性植物品種の育成に広く応用できる。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：1322

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

配列

GAGGCAGTTCTGTTGCCACTCTCTCTCCTGTCAATGATGGATCTCAGAAATACCCAGCCAAATCTCTGGAC
AAGTTCATTAAGAGACTATCTCTGCCAGACACGTGTTCCGCATGCAAATGACCATGCCATTGACATCATC
TGTGGGTTCTGAAGGAAAGGTGCTCCGAGGTAGCTCCTACCCCTGTGTGTGTCCAAGGTGGTAAAGGGT
GGCTCCTCAGGCAAGGGCACCACCCCTCAGAGGGCGATCTGACGCTGACCTGGTGTCTCCTCAGTCCTCTC
ACCACTTTCAAGGATCAGTTAAATGCCGGGGAGAGTTCATCCAGGAATTAGGAGACAGCTGGAAGCCTGT
CAAAGAGAGAGAGCACTTCCGTGAAGTTGAGGTCCAGGCTCCAGCTGGGCAACCCCCGTGCGCTCAGC
TTCGTACTGAGTTCGCTCCAGCTCGGGGAGGGGGTGGAGTTGATGTGCTGCCTGCCTTGTGCCCTGGGT
CAGTTGACTGGCAGCTATAAACCTAACCCCCAAATCTATGTCAAGCTCATCGAGGAGTGCACCGACCTGCAG
AAAGAGGGCGAGTTCTCACCTGCTCACAGAACTACAGAGAGACTTCCTGAAGCAGCGCCCCACCAAGCTC
AAGAGCCTCATCCGCCTAGTCAAGCACTGGTACCAAAATTGTAAGAAGAAGCTTGGGAAGCTGCCACCTCAG
TATGCCCTGGAGCTCCTGACGGCTATGCTTGGAGCGAGGGAGCATGAAAACACATTCAACACAGCCAA
GGATTTCGGACGGTCTTGAATTAGTCATAAACTACCAAGCAACTCTGCATCTACTGGACAAAGTATTATGAC
TTAAAAACCCATTATTGAAAAGTACCTGAGAAGGCAGCTCACGAAACCCAGGCCTGTGATCTGGACCCG
GCGGACCCCTACAGGAAACTTGGGTGGAGACCCAAAGGGTTGGAGGCAGCTGGCACAAGAGGCTGAGGCC
TGGCTGAATTACCCATGCTTAAAGAATTGGGATGGGTCCCCAGTGAGCTCTGGATTCTGCTGGTGAGACCT
CCTGCTTCCCTCCCTGCCATTCATCCCTGCCCTCTCCATGAAGCTTGAAGACATATAAGCTGGAGACCATTCTT
TCCAAAGAACTTACCTCTGCCAAAGGCCATTATATTATAGTGACAGGCTGTGCTCCATATTITACAG
TCATTGGTCACAATCGAGGGTTCTGGAATTTCACATCCCTGTCCAGAATTCAITCCCCTAAGAGTAA
TAATAAATAATCTCTAACACCAAAAA

配列番号：2

配列の長さ：50

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTATTGAAAA GTACCTGAGA AGGCAGCTCA CGAAACCCAG GCCTGTGATC 50

配列番号：3

配列の長さ：2378

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

配列

CTTGATTAAGTGCTAGGAGATAAATTCATTTCTAAGGAAAAGGCTAAAGTGGTAGCAGGTGGCATT
 TACCGTCATGGAGAGCAGGGATCATAACAAACCCCCAGGAGGGACCCACGTCCCTCAGCGGTAGAAGGGCTGC
 AGTGGAAAGACAATCACTTGCTGATTAAGCTGTTCAAACGAAGATGTTGACCTGGTCCAGCAATTGCTGGA
 AGGTGGAGCCAATGTTAATTCCAGGAAGAGGAAGGGGGCTGGACACCTCTGCATAACGCACTACAATGAG
 CAGGGAGGACATTGTGGAACCTCTGCTTCGTATGGTGTGACCTGTTCTGAGGAAGAAGAATGGGCCAC
 GCCTTTTATCCTCGCAGCGATTGCGGGGAGCGTGAAGCTGCTGAAACTTTCTTCAAAGGAGCAGATGT
 CAATGAGTGTGATTATGGCTTCACAGCCTCATGGAAGCCGCTGTGATGGTAAGGTCAAAGCCCTAAA
 ATTCCCTTATAAGAGAGGAGCAAATGTGAATTGAGGCAGAAAGACAAAGGAGGATCAAGAGCGGCTGAGGAA
 AGGAGGGGCCACAGCTCATGGACGCTGCTGAAAAGGACACGTAGAGGTCTTGAAGATTCTCCTGATGA
 GATGGGGGCAGATGTAAACGCCCTGTGACAATATGGCAGAAATGCCCTGATCCATGCTCTCCTGAGCTCTGA
 CGATAGTGTGAGGGCTATTACGCATCTGCTGGACCATGGGCTGATGTCAATGTGAGGGAGAAAG
 AGGGAAGACTCCCCTGATCCCTGGCAGTGGAGAAGCACTTGGGTTGGTGCAGAGGCTCTGGAGCAAGA

GCACATAGAGATTAATGACACAGACAGTGTGGCAAAACAGCACTGCTGCTGTTGAACCTAAACTGAA
 GAAAATGCCGAGTTGCTGTGCAAACGTGGAGCCAGTACAGATTGTGGGGATCTTGTATGACAGCGAGGCG
 GAATTATGACCATTCCCTGTGAAGGTTCTCTCTCATGGAGCCAAGAAGATTTCACCCCTGCTGA
 AGACTGGAAGCCTCAGAGCTCACACTGGGGGCAGCCCTGAAGGATCTCACAGAAATACCGCCCTATGAT
 TGGCAAACCTCAAGTTCTTATTGATGAAAATACAAATTGCTGATACTTCAGAAGGAGGCATCTACCTGGG
 GTTCTATGAGAAGCAAGAAGTAGCTGTGAAGACGTTCTGTGAGGGCAGCCCACGTGCACAGCGGAAGTCTC
 TTGTCTGCAAAGCAGCCGAGAGAACAGTCACTTGGTACATCTATGGGAGTGAGAGGCCACAGGGCCACTT
 GTTGTGTGTGTCACCCCTGTGAGCAGACTCTGGAAGCGTGTGGATGTGCACAGAGGGAAAGATGTGGA
 AAATGAGGAAGATGAATTGCCGAAATGTCTGTACATCTATTTAAGGCTGTTCAAGAACTACACTTGTC
 CTGTGGATAACCCACCAGGATCTGCAACCACAAACATCTTAATAGATTCTAAGAAAGCTGCTCACCTGGC
 AGATTTTATAAGAGCATCAAGTGGGCTGGAGATCCACAGGAAGTCAAGAGAGATCTAGAGGACCTGGACG
 GCTGGTCCTCTATGTGGTAAAGAAGGGAAAGCATTGAGGATCTGAAAGCTCAAAGTAATGAAGAGGT
 GGTTCAACTTCTCCAGATGAGGAAACTAAGGACCTCATTCACTGCTCTTCCATCTGGGAACATGTGAG
 GGACTGTCTGAGTGACCTGCTGGTCATCCCTCTTGGACTTGGAGAGGCCCTATAGGACGCTCGGAA
 TGTGGAAATGAATCCGACATCAAAACACGAAAATCTGAAAGTGAGATCCTCAGACTACTGCAACCTGGCC
 TTCTGAACATTCAAAAGTTTGACAAGTGGACGACTAAGATTGAATGTGTTATGAAAAAAATGAATAA
 GTTTATGAAAAAGAGGCAATTCTACAGAACACTGTGGGTGATCTGCTAAAGTTCACTGGGAATTGGG
 AGAACACATTGATGAAGAAAAGCATAAAAGATGAAATTAAAATTGGAGACCTCCCTGTATTTCAGAA
 GACATTCCAGATCTGGTGATCTATGTCACACAAACTACAGAACACAGAAATAGAAAGCATTCCCCA
 AACCCACAGTCCAAACAAACCTCAGTGTGATGGAGCTGGTGGGGCAGTGGTTGCCAGCCCTGGGTGCTG
 ATGGACTGATTGCTGGAGTTCAAGGAAACTACTTATTAGCTGTAGAGTCCTGGCAAATCACACATTCTGG
 GC

配列番号：4

配列の長さ：51

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成D N A

配列

AATGGGGCCA CGCTTTTAT CCTCGCAGCG ATTGCGGGGA GCGTGAAGCT G 51

配列番号：5

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCCAAGGTGG TAAAGGGTGG CTCCTCAGGC AA

配列番号：6

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTCTTGAGCT TGGTGGGGCG CTGCTTCAGG AA

配列番号：7

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTGGGGTTCT ATGAGAAGCA AGAAGTAGCT GTGAA

配列番号：8

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GACAAGTGTA GTTCTTGAAC AGCCTTAAAT ATAGA

配列番号：9

配列の長さ：1170

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ウシ

配列

5'	ATG	GAA	CTC	AGA	TAT	ACC	CCG	GCC	GGG	TCT	CTA	GAC	AAG	TTC	ATC	CAA	GTC	CAC	
	M	E	L	R	Y	T	P	A	G	S	L	D	K	F	I	Q	V	H	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
	63																	108	
	CTC	CTG	CCA	AAC	GAA	GAA	TTC	AGC	ACG	CAG	GTC	CAA	GAA	GCC	ATC	GAC	ATC	ATC	
	L	L	P	N	E	E	F	S	T	Q	V	Q	E	A	I	D	I	I	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
	117																	162	
	TGC	ACT	TTC	CTG	AAG	GAA	AAG	TGT	TTC	CGA	TGT	GCC	CCT	CAC	AGA	GTT	CGG	GTG	
	C	T	F	L	K	E	K	C	F	R	C	A	P	H	R	V	R	V	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
	171																	216	
	TCC	AAA	GTT	GTG	AAG	GTC	GGC	GGC	TCC	TCA	GGC	AAA	GTC	ACG	ACC	CTC	AGG	GGA	CGA
	S	K	V	V	K	G	G	S	S	G	K	G	T	T	L	R	G	R	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
	225																	270	
	TCA	GAT	GCT	GAC	CTC	GTC	GTC	TTC	TTC	CTC	ACC	AAT	CTC	ACA	AGT	TTT	CAG	GAA	CAG
	S	D	A	D	L	V	V	F	L	T	N	L	T	S	F	Q	E	Q	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
	279																	324	
	CTT	GAG	CGC	CGA	GGG	GAA	TTC	ATT	GAA	GAA	ATC	AGG	AGA	CAG	CTG	GAA	GCC	TGT	
	L	E	R	R	G	E	F	I	E	E	I	R	R	Q	L	E	A	C	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
	333																	378	
	CAA	AGA	GAG	GAA	ACA	TTT	GAA	GTG	AAG	TTT	GAG	GTC	CAG	AAA	CGG	CAA	TGG	GAG	
	Q	R	E	E	T	F	E	V	K	F	E	V	Q	K	R	Q	W	E	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		

AAT	CCC	CGC	GCT	CTC	AGC	TTT	GTG	CTG	AGG	TCC	CCC	AAG	CTC	AAC	CAG	GCG	GTG
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N	P	R	A	L	S	F	V	L	R	S	P	K	L	N	Q	A	V
441	450	459	468	477	486												
GAG	TTC	TAT	GTC	CTG	CCC	GCC	TTT	GAT	GCC	CTA	GGT	CAG	TTG	ACC	AAA	GGT	TAC
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
E	F	Y	V	L	P	A	F	D	A	L	G	Q	L	T	K	G	Y
495	504	513	522	531	540												
AGA	CCT	GAC	TCT	AGA	GTC	TAT	GTC	CGG	CTC	ATC	CAA	GAG	TGC	GAG	AAC	CTG	AGG
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R	P	D	S	R	V	Y	V	R	L	I	Q	E	C	E	N	L	R
549	558	567	576	585	594												
AGA	GAG	GGC	GAG	TTC	TCC	CCC	TGC	TTC	ACG	GAG	CTG	CAG	CGA	GAC	TTC	CTG	AAG
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R	E	G	E	F	S	P	C	F	T	E	L	Q	R	D	F	L	K
603	612	621	630	639	648												
AAT	CGT	CCA	ACC	AAG	CTG	AAG	AAC	CTC	ATC	CGC	CTG	GTG	AAG	CAC	TGG	TAC	CAA
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N	R	P	T	K	L	K	N	L	I	R	L	V	K	H	W	Y	Q
657	666	675	684	693	702												
CTG	TGT	AAG	GAG	CAG	CTT	GGG	AAG	CCA	TTG	CCC	CCA	CAA	TAT	GCT	CTG	GAG	CTT
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
L	C	K	E	Q	L	G	K	P	L	P	P	Q	Y	A	L	E	L
711	720	729	738	747	756												
CTG	ACG	GTC	TAT	GCC	TGG	GAA	CAA	GGA	TGC	AAT	AAA	ACA	GGA	TTC	ATC	ACA	GCT
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
L	T	V	Y	A	W	E	Q	G	C	N	K	T	G	F	I	T	A
765	774	783	792	801	810												
CAG	GGA	TTT	CAG	ACT	GTC	TTG	AAA	TTA	GTC	CTA	AAG	TAT	CAG	AAG	CTT	TGC	ATC
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Q	G	F	Q	T	V	L	K	L	V	L	K	Y	Q	K	L	C	I
819	828	837	846	855	864												
TAC	TGG	GAA	AAG	AAC	TAT	AAC	TCT	GAA	AAC	CCT	ATT	ATT	GAA	GAA	TAT	CTG	ACG
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Y	W	E	K	N	Y	N	S	E	N	P	I	I	E	E	Y	L	T
873	882	891	900	909	918												
AAG	CAA	CTT	GCA	AAA	CCC	AGG	CCT	GTG	ATT	CTG	GAC	CCG	GCG	GAC	CCT	ACA	GGA
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
K	Q	L	A	K	P	R	P	V	I	L	D	P	A	D	P	T	G
927	936	945	954	963	972												
AAT	GTT	GCT	GGT	AAA	GAC	GCA	TAT	AGC	TGG	GAA	CGG	CTT	GCA	CGA	ACG	GCT	TTG
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N	V	A	G	K	D	A	Y	S	W	E	R	L	A	R	T	A	L
981	990	999	1008	1017	1026												
GTC	TGG	CTG	GAT	TAC	CCG	TGC	TTT	AAG	AAA	TGG	GAT	GGG	TCT	CCC	GTG	GGC	TCC
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
V	W	L	D	Y	P	C	F	K	K	W	D	G	S	P	V	G	S
1035	1044	1053	1062	1071	1080												
TGG	GAT	GTG	TCG	CCC	CAA	GAA	CAC	AGT	GAC	CTG	ATG	TTC	CAG	GCC	TAT	GAT	TTT
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
W	D	V	S	P	Q	E	H	S	D	L	M	F	Q	A	Y	D	F

1089	1098	1107	1116	1125	1134
AGA CAG CAC TAT AGA CCC	TCT CCA GGA ATC	CAG TTC	CAC GGA GGA	GCC TCT CCC	
R Q H Y R P S P G I Q F H G G A S P					
1143	1152	1161	1170		
CAG GTG GAA GAG AAC TGG ACA TGT ACC ATC CTC TGA 3'					
Q V E E N W T C T I L *					

配列番号：10

配列の長さ：2157

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ウシ

配列

5'	ATG GAG ACT GAG AGC	CAT AAC AAC	CCT CAG GAA AGA	CCC ACA CCC	TCT AGT AAT	54
	M E T E S H N N	P Q E R P T P	S S S N			
63	GGG AAG GCT TCA ATG GGA GAC AAT	CAT TCG TTG ATT	AAA GCT GTT AGA GAT	99	108	
	G K A S M G D N H S L I K A V R D E					
117	GAC ATT GAG TCG GTC CAG CAA TTG	126 135	144	153	162	
	D I E S V Q Q L L E R G A D V N F Q					
171	GAA GAA TGG GGC TGG TCA CCT TTG	180 189	198	207	216	
	E E W G W S P L H N A V Q V D R E D					
225	ATT GTG GAA CTT CTG CTT AGT CAT	234 243	252	261	270	
	I V E L L S H G A E P C L R K K N					
279	GGG GCC ACT CCC TTC ATC ATT GCT	288 297	306	315	324	
	G A T P F I I A G I V G N V K L L K					

333	342	351	360	369	378
CTA TTA CTT CCT AAA GTA ACA GAT GTC AAT GAG TGT GAT GTT AAT GGC TTC ACA					
L L L P K V T D V N E C D V N G F T					
387	396	405	414	423	432
GCT TTC ATG GAA GCT GCT GTG TAT GGC AAA GTC GAA GCC TTA AGA TTC CTG TAT					
A F M E A A V Y G K V E A L R F L Y					
441	450	459	468	477	486
AAC AAC GGA GCA GAG GTG AAT TTG CAC AGA AAG ACA ATA GAG GAT CAA GAG AGG					
N N G A E V N L H R K T I E D Q E R					
495	504	513	522	531	540
GTT AAG AAA GGA GGG GCC ACT GCT CTC ATG GAT GCT GCT AGA AGA GGG CAT GTA					
V K K G G A T A L M D A A R R G H V					
549	558	567	576	585	594
GAT GTC GTA GAG ATC CTC CTT CAT GAG ATG GGG GCA GAT GTC AAT GCT CGG GAC					
D V V E I L L H E M G A D V N A R D					
603	612	621	630	639	648
AAT AGG GGC AGA AAT GCT TTA ATC TAT GCT CTT CTG AAC TCT GAT GAT GAG AAG					
N R G R N A L I Y A L L N S D D E K					
657	666	675	684	693	702
GTG AAA GTG AAA GCN ACT ACT CGC CTT CTG CTG GAC TAT AAG GTT GAT GTC AAT					
V K V K A T T R L L L D Y K V D V N					
711	720	729	738	747	756
GTG AGG GGG GAA GGA AGG AAG ACG CCG CTG ATC TTG GCA GTG GAA AAG AAG AAC					
V R G E G R K T P L I L A V E K K N					
765	774	783	792	801	810
CTG GAT CTG GTG CAG ATG CTT CTG GAA CAA ACA GCT ATA GAG ATT AAT GAC ACA					
L D L V Q M L L E Q T A I E I N D T					
819	828	837	846	855	864
GAC AGT GAG GGT AAA ACA GCA CTG CTG CTT GCT GTC GAG CTC AAG CTG AAG GAA					
D S E G K T A L L L A V E L K L K E					
873	882	891	900	909	918
ATT GCC CAG TTG CTG TGT CGC AAA GGA GCC AGC ACA AAA TGC GGG GAC CTC GTC					
I A Q L L C R K G A S T K C G D L V					
927	936	945	954	963	972
GCA ATA GCG AAG CGC AAT TAT GAC TCT GAC CTT GCA AAG TTC CTT CGC CAG CAT					
A I A K R N Y D S D L A K F L R Q H					
981	990	999	1008	1017	1026
GGA GCT GTA GAA GAC GTT TGC CCT CCT GCT AAA GCC TGG AAG CCT CAG AGC TCA					
G A V E D V C P P A K A W K P Q S S					

CGT	TGG	GGG	GAG	GCC	CTG	AAA	CAT	CTT	CAC	AGG	ATA	TAC	CGC	CCT	ATG	ATA	GGC
R	W	G	E	A	L	K	H	L	H	R	I	Y	R	P	M	I	G
AAA	CTC	AAG	ATC	TTT	ATT	GAT	GAA	GAA	TAT	AAA	ATC	GCT	GAC	ACT	TCC	CAA	GGG
K	L	K	I	F	I	D	E	E	Y	K	I	A	D	T	S	Q	G
GGC	ATC	TAC	CTG	GGG	TTA	TAT	GAG	GAA	CAA	GAG	GTA	GCT	GTG	AAG	CGG	TTC	CCT
G	I	Y	L	G	L	Y	E	E	Q	E	V	A	V	K	R	F	P
AAA	GGC	AGC	ACA	CGG	GGA	CAA	AAT	GAA	GTC	TCT	TGT	TTG	CAG	AGC	AAC	CGA	GCC
K	G	S	T	R	G	Q	N	E	V	S	C	L	Q	S	N	R	A
AAT	GGT	CAC	GTG	GTG	ACG	TTC	TAT	GGC	AGT	GAG	AGC	GAC	AGG	ACC	TGT	CTG	TAT
N	G	H	V	V	T	F	Y	G	S	E	S	D	R	T	C	L	Y
GTG	TGC	CTT	GCC	CTG	TGT	GAG	CAC	ACG	CTG	GAG	AAG	CAC	TTG	GAC	GAC	CGC	AAA
V	C	L	A	L	C	E	H	T	L	E	K	H	L	D	D	R	K
GGA	GAG	GCT	GTG	CAA	AAC	AAG	GAA	GAT	GAA	TTT	GCC	CGC	AAC	ATC	CTC	TCA	TCT
G	E	A	V	Q	N	K	E	D	E	F	A	R	N	I	L	S	S
CTG	TTT	AAG	GCT	GTT	GAG	GAA	CTA	CAC	CGG	TCT	GGA	TAC	ACT	CAT	CAG	GAT	CTG
L	F	K	A	V	E	E	L	H	R	S	G	Y	T	H	Q	D	L
CAA	CCG	CAG	AAC	ATC	TTA	ATA	GAT	TCC	AAG	AAT	GGT	GCT	TGC	CTG	GCA	GAT	TTT
Q	P	Q	N	I	L	I	D	S	K	N	G	A	C	L	A	D	F
GAT	AAA	AGC	GTC	AAG	GGG	ACT	GGA	GAT	CCA	CAG	GAA	ATC	AAG	AGA	GAT	CTA	GAG
D	K	S	V	K	G	T	G	D	P	Q	E	I	K	R	D	L	E
GCC	CTG	GGA	CTG	CTG	GTC	CTA	TAT	GTG	GTA	AAA	AAG	GGA	AAT	GAT	TCT	TTT	GAG
A	L	G	L	L	V	L	Y	V	V	K	K	G	N	D	S	F	E
ATG	CTG	AAG	AAT	CTA	AGA	ACT	GAA	GAG	TTG	ATT	GAG	CGT	TCT	CCA	GAT	AAG	GAA
M	L	K	N	L	R	T	E	E	L	I	E	R	S	P	D	K	E
ACT	CGG	GAC	CTC	ATT	CGG	CAT	CTG	TTA	GTC	CCT	GGG	GAC	AAT	GTG	AAG	GGC	CAT
T	R	D	L	I	R	H	L	L	V	P	G	D	N	V	K	G	H

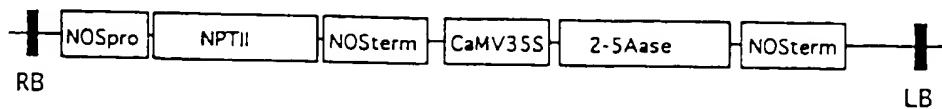
1737	1746	1755	1764	1773	1782
CTG AGT GGC CTG CTG GCT CAT CCC TTC TTT TGG AGT TGG GAG AGC CGC CGC	CTG GCT CAT CCC TTC TTT TGG AGT TGG GAG AGC CGC TAC CGG	CTG GCT CAT CCC TTC TTT TGG AGT TGG GAG AGC CGC TAC CGG	CTG GCT CAT CCC TTC TTT TGG AGT TGG GAG AGC CGC TAC CGG	CTG GCT CAT CCC TTC TTT TGG AGT TGG GAG AGC CGC TAC CGG	CTG GCT CAT CCC TTC TTT TGG AGT TGG GAG AGC CGC TAC CGG
L S G L L A H P F F W S W E S R Y R	L S G L L A H P F F W S W E S R Y R	L S G L L A H P F F W S W E S R Y R	L S G L L A H P F F W S W E S R Y R	L S G L L A H P F F W S W E S R Y R	L S G L L A H P F F W S W E S R Y R
1791	1800	1809	1818	1827	1836
ACC CTA CGG GAT GTG GGA AAC GAA TCT GAC ATC AAA ACA CGA AAT ACT AAT GGC	ACC CTA CGG GAT GTG GGA AAC GAA TCT GAC ATC AAA ACA CGA AAT ACT AAT GGC	ACC CTA CGG GAT GTG GGA AAC GAA TCT GAC ATC AAA ACA CGA AAT ACT AAT GGC	ACC CTA CGG GAT GTG GGA AAC GAA TCT GAC ATC AAA ACA CGA AAT ACT AAT GGC	ACC CTA CGG GAT GTG GGA AAC GAA TCT GAC ATC AAA ACA CGA AAT ACT AAT GGC	ACC CTA CGG GAT GTG GGA AAC GAA TCT GAC ATC AAA ACA CGA AAT ACT AAT GGC
T L R D V G N E S D I K T R N T N G	T L R D V G N E S D I K T R N T N G	T L R D V G N E S D I K T R N T N G	T L R D V G N E S D I K T R N T N G	T L R D V G N E S D I K T R N T N G	T L R D V G N E S D I K T R N T N G
1845	1854	1863	1872	1881	1890
AAG ATC CTC CAG CTT CTG CAA CCT GAA ACA TCT GAA CTT CCA AGT TTT GCC CAG	AAG ATC CTC CAG CTT CTG CAA CCT GAA ACA TCT GAA CTT CCA AGT TTT GCC CAG	AAG ATC CTC CAG CTT CTG CAA CCT GAA ACA TCT GAA CTT CCA AGT TTT GCC CAG	AAG ATC CTC CAG CTT CTG CAA CCT GAA ACA TCT GAA CTT CCA AGT TTT GCC CAG	AAG ATC CTC CAG CTT CTG CAA CCT GAA ACA TCT GAA CTT CCA AGT TTT GCC CAG	AAG ATC CTC CAG CTT CTG CAA CCT GAA ACA TCT GAA CTT CCA AGT TTT GCC CAG
K I L Q L L Q P E T S E L P S F A Q	K I L Q L L Q P E T S E L P S F A Q	K I L Q L L Q P E T S E L P S F A Q	K I L Q L L Q P E T S E L P S F A Q	K I L Q L L Q P E T S E L P S F A Q	K I L Q L L Q P E T S E L P S F A Q
1899	1908	1917	1926	1935	1944
TGG ACA ATT GAG GTT GAC AAA TCT GTG ATG AAA AAA ATG AAT ACC TAT CAG AAC	TGG ACA ATT GAG GTT GAC AAA TCT GTG ATG AAA AAA ATG AAT ACC TAT CAG AAC	TGG ACA ATT GAG GTT GAC AAA TCT GTG ATG AAA AAA ATG AAT ACC TAT CAG AAC	TGG ACA ATT GAG GTT GAC AAA TCT GTG ATG AAA AAA ATG AAT ACC TAT CAG AAC	TGG ACA ATT GAG GTT GAC AAA TCT GTG ATG AAA AAA ATG AAT ACC TAT CAG AAC	TGG ACA ATT GAG GTT GAC AAA TCT GTG ATG AAA AAA ATG AAT ACC TAT CAG AAC
W T I E V D K S V M K K M N T Y Q N	W T I E V D K S V M K K M N T Y Q N	W T I E V D K S V M K K M N T Y Q N	W T I E V D K S V M K K M N T Y Q N	W T I E V D K S V M K K M N T Y Q N	W T I E V D K S V M K K M N T Y Q N
1953	1962	1971	1980	1989	1998
ACT GTA GGT GAC CTG CTG AAG TTC ATC CGG AAT GTG GGA GAG CAC ATT AAT GAA	ACT GTA GGT GAC CTG CTG AAG TTC ATC CGG AAT GTG GGA GAG CAC ATT AAT GAA	ACT GTA GGT GAC CTG CTG AAG TTC ATC CGG AAT GTG GGA GAG CAC ATT AAT GAA	ACT GTA GGT GAC CTG CTG AAG TTC ATC CGG AAT GTG GGA GAG CAC ATT AAT GAA	ACT GTA GGT GAC CTG CTG AAG TTC ATC CGG AAT GTG GGA GAG CAC ATT AAT GAA	ACT GTA GGT GAC CTG CTG AAG TTC ATC CGG AAT GTG GGA GAG CAC ATT AAT GAA
T V G D L L K F I R N V G E H I N E	T V G D L L K F I R N V G E H I N E	T V G D L L K F I R N V G E H I N E	T V G D L L K F I R N V G E H I N E	T V G D L L K F I R N V G E H I N E	T V G D L L K F I R N V G E H I N E
2007	2016	2025	2034	2043	2052
CAA AAG AAT ATA GAG ATG AAG TCA AAA ATT GGA GAA CCT TCC CAG TAT TTT CAG	CAA AAG AAT ATA GAG ATG AAG TCA AAA ATT GGA GAA CCT TCC CAG TAT TTT CAG	CAA AAG AAT ATA GAG ATG AAG TCA AAA ATT GGA GAA CCT TCC CAG TAT TTT CAG	CAA AAG AAT ATA GAG ATG AAG TCA AAA ATT GGA GAA CCT TCC CAG TAT TTT CAG	CAA AAG AAT ATA GAG ATG AAG TCA AAA ATT GGA GAA CCT TCC CAG TAT TTT CAG	CAA AAG AAT ATA GAG ATG AAG TCA AAA ATT GGA GAA CCT TCC CAG TAT TTT CAG
Q K N I E M K S K I G E P S Q Y F Q	Q K N I E M K S K I G E P S Q Y F Q	Q K N I E M K S K I G E P S Q Y F Q	Q K N I E M K S K I G E P S Q Y F Q	Q K N I E M K S K I G E P S Q Y F Q	Q K N I E M K S K I G E P S Q Y F Q
2061	2070	2079	2088	2097	2106
GAG AAA TTT CCA GAT CTG GTC ATG TAT GTC TAT AAA AGA CTA CAG AAC ACA GAA	GAG AAA TTT CCA GAT CTG GTC ATG TAT GTC TAT AAA AGA CTA CAG AAC ACA GAA	GAG AAA TTT CCA GAT CTG GTC ATG TAT GTC TAT AAA AGA CTA CAG AAC ACA GAA	GAG AAA TTT CCA GAT CTG GTC ATG TAT GTC TAT AAA AGA CTA CAG AAC ACA GAA	GAG AAA TTT CCA GAT CTG GTC ATG TAT GTC TAT AAA AGA CTA CAG AAC ACA GAA	GAG AAA TTT CCA GAT CTG GTC ATG TAT GTC TAT AAA AGA CTA CAG AAC ACA GAA
E K F P D L V M Y V Y K R L Q N T E	E K F P D L V M Y V Y K R L Q N T E	E K F P D L V M Y V Y K R L Q N T E	E K F P D L V M Y V Y K R L Q N T E	E K F P D L V M Y V Y K R L Q N T E	E K F P D L V M Y V Y K R L Q N T E
2115	2124	2133	2142	2151	
TAT GCA AAG CAT TTT CCA AAA AAT CTC AAC CTG AAC AAA CCC GAC GTG TGA 3'	TAT GCA AAG CAT TTT CCA AAA AAT CTC AAC CTG AAC AAA CCC GAC GTG TGA 3'	TAT GCA AAG CAT TTT CCA AAA AAT CTC AAC CTG AAC AAA CCC GAC GTG TGA 3'	TAT GCA AAG CAT TTT CCA AAA AAT CTC AAC CTG AAC AAA CCC GAC GTG TGA 3'	TAT GCA AAG CAT TTT CCA AAA AAT CTC AAC CTG AAC AAA CCC GAC GTG TGA 3'	TAT GCA AAG CAT TTT CCA AAA AAT CTC AAC CTG AAC AAA CCC GAC GTG TGA 3'
Y A K H F P K N L N L N K P D V *	Y A K H F P K N L N L N K P D V *	Y A K H F P K N L N L N K P D V *	Y A K H F P K N L N L N K P D V *	Y A K H F P K N L N L N K P D V *	Y A K H F P K N L N L N K P D V *

請 求 の 範 囲

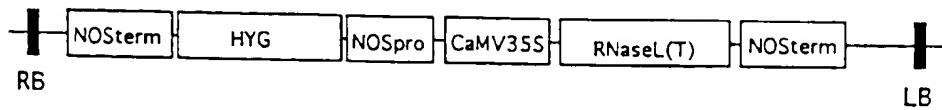
1. 動物細胞由来2',5'オリゴアデニル酸合成酵素をコードするDNA配列及び動物細胞由来リボヌクレアーゼLをコードするDNA配列を植物染色体中に組み込んで発現させることにより、RNAウイルスに抵抗性を持つ植物を作出する方法。
2. 動物細胞由来2',5'オリゴアデニル酸合成酵素をコードするDNA配列がヒト、マウス、ラット又はウシのいずれか由来である請求の範囲第1項記載の方法。
3. 動物細胞由来2',5'オリゴアデニル酸合成酵素をコードするDNA配列がヒト、マウス、ラット又はウシのいずれか由来のcDNAである請求の範囲第2項記載の方法。
4. 動物細胞由来リボヌクレアーゼLをコードするDNA配列がヒト又はウシ由来である請求の範囲第1項記載の方法。
5. 動物細胞由来リボヌクレアーゼLをコードするDNA配列がヒト又はウシ由来のcDNAである請求の範囲第4項記載の方法。
6. 動物細胞由来2',5'オリゴアデニル酸合成酵素をコードするDNA配列がヒト、マウス、ラット又はウシのいずれか由来であり、かつ動物細胞由来リボヌクレアーゼLをコードするDNA配列がヒト又はウシ由来である請求の範囲第1項記載の方法。
7. 動物細胞由来2',5'オリゴアデニル酸合成酵素をコードするDNA配列がヒト、マウス、ラット又はウシのいずれか由来のcDNAであり、かつ動物細胞由来リボヌクレアーゼLをコードするDNA配列がヒト又はウシ由来のcDNAである請求の範囲第6項記載の方法。
8. 請求の範囲第1項記載の方法によって作出された植物。
9. 動物細胞由来2',5'オリゴアデニル酸合成酵素をコードするDNA配列及び動物細胞由来リボヌクレアーゼLをコードするDNA配列を植物染色体中に組み込んだ植物。

F I G . 1

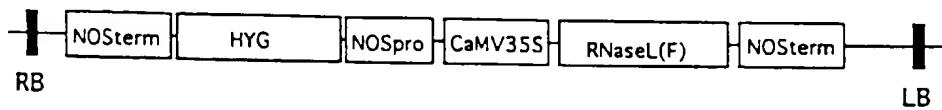
pBI2-5Aase



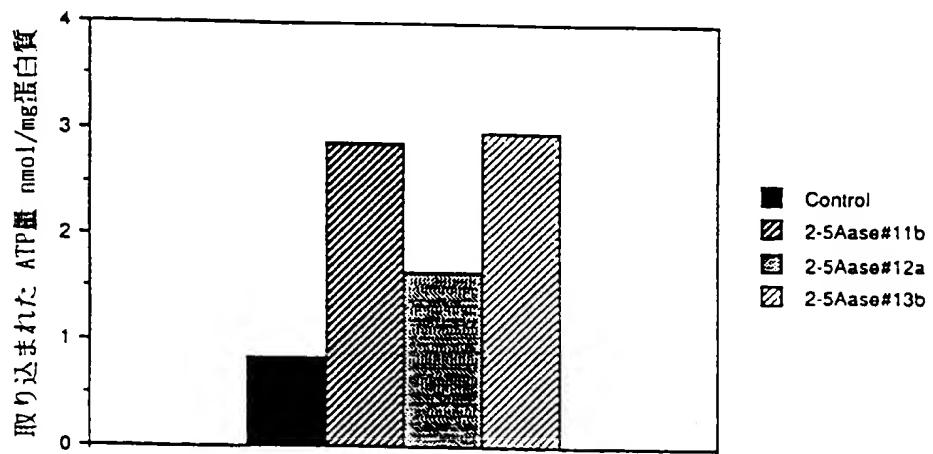
pBIBRNaseL(T)



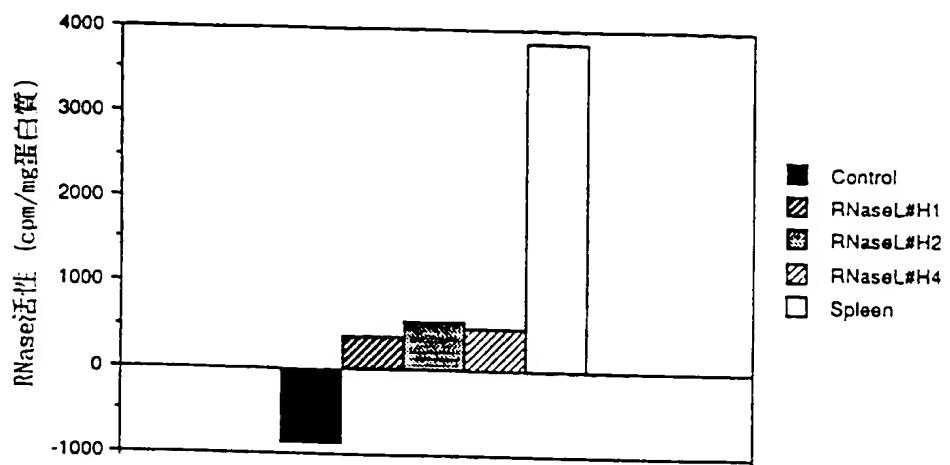
pBIBRNaseL(F)



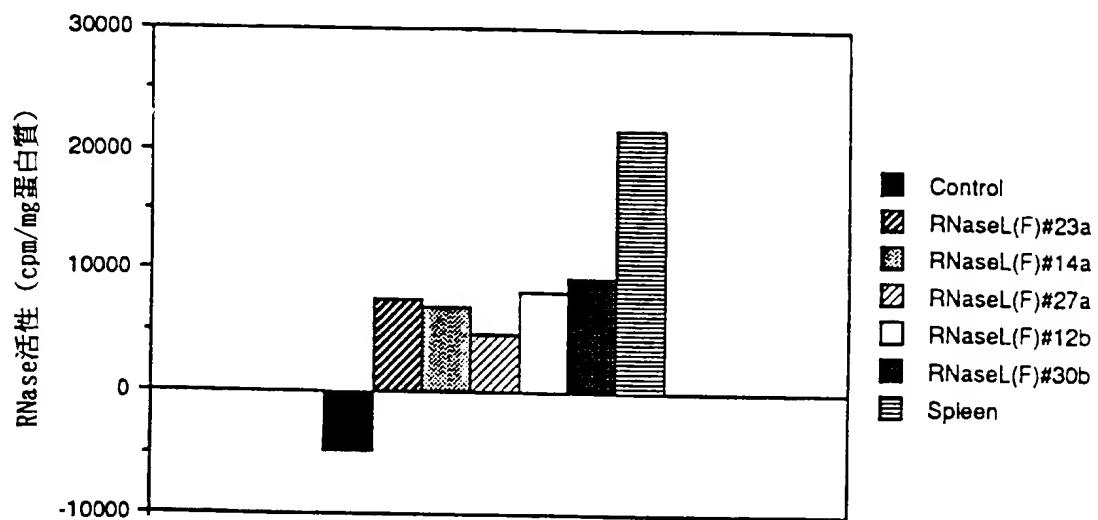
F I G . 2



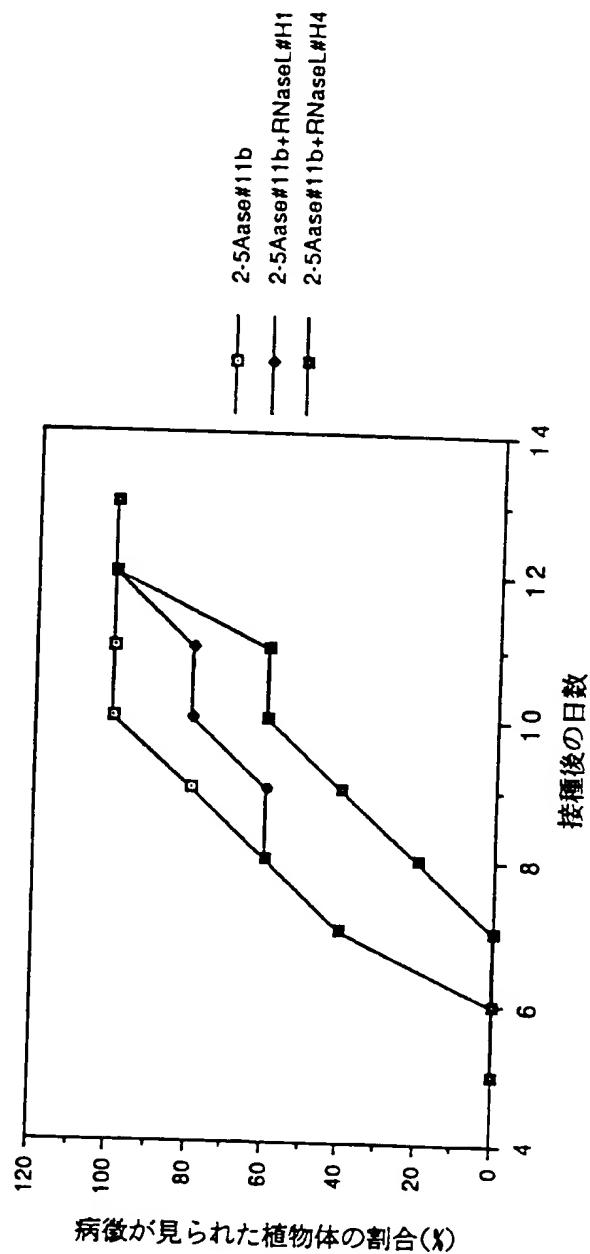
F I G . 3



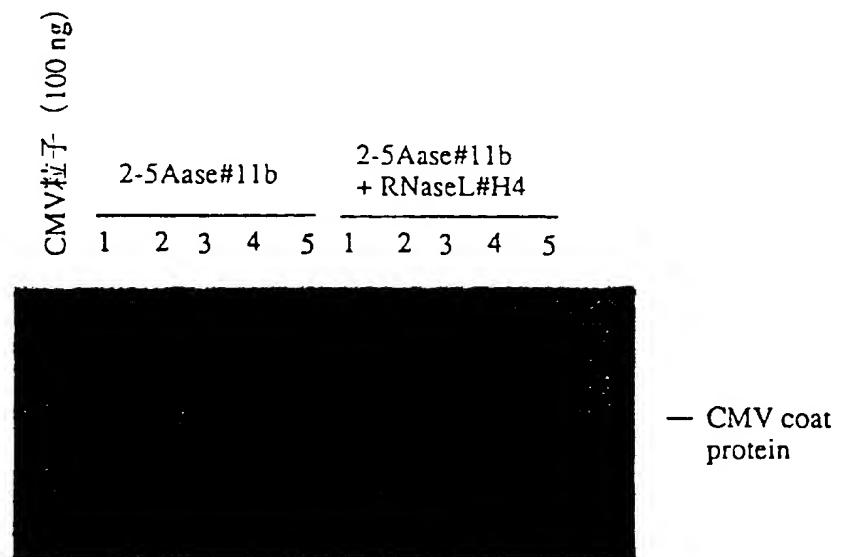
F I G . 4



F I G. 5



F I G. 6



F I G. 7 A

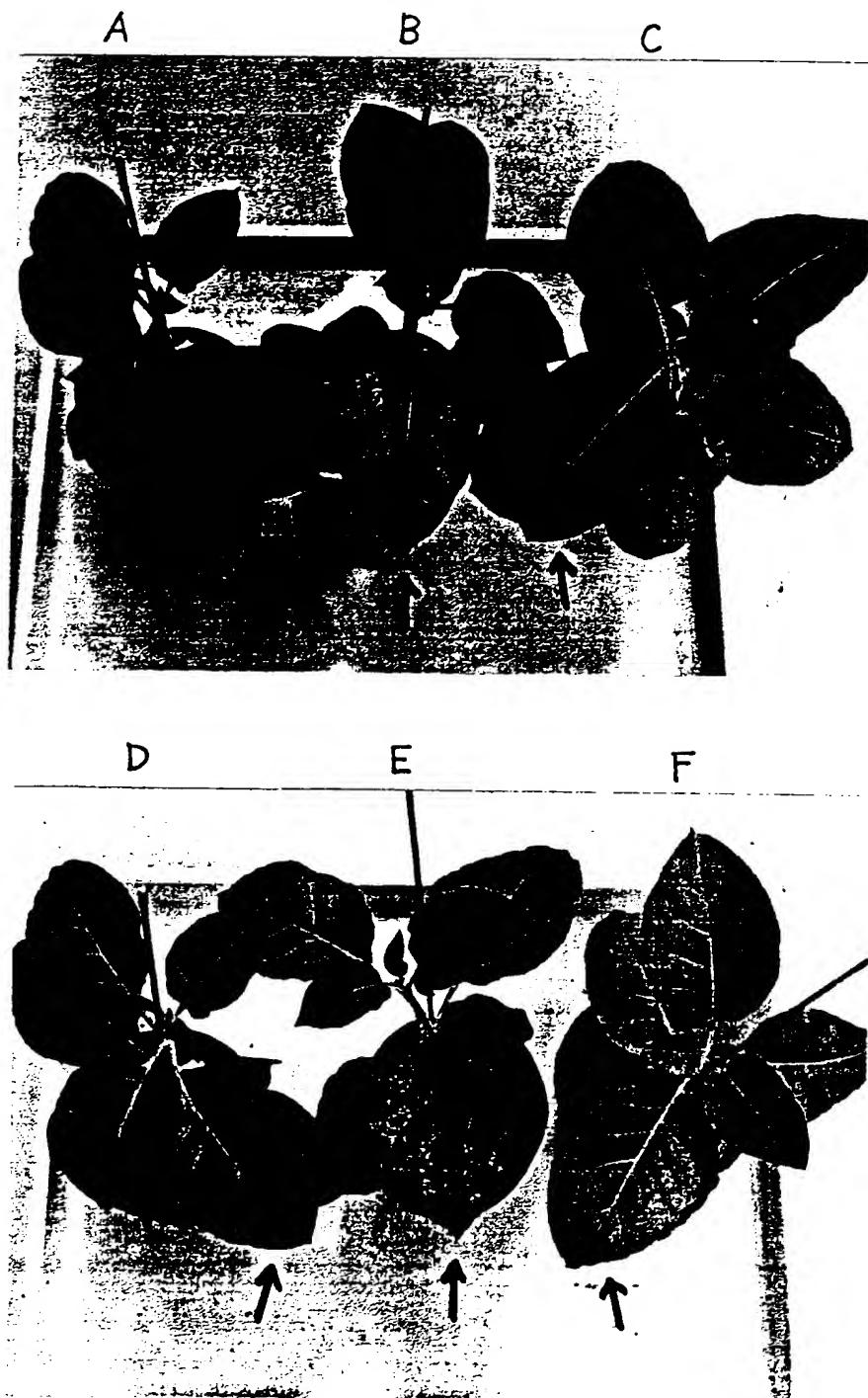


FIG. 7B

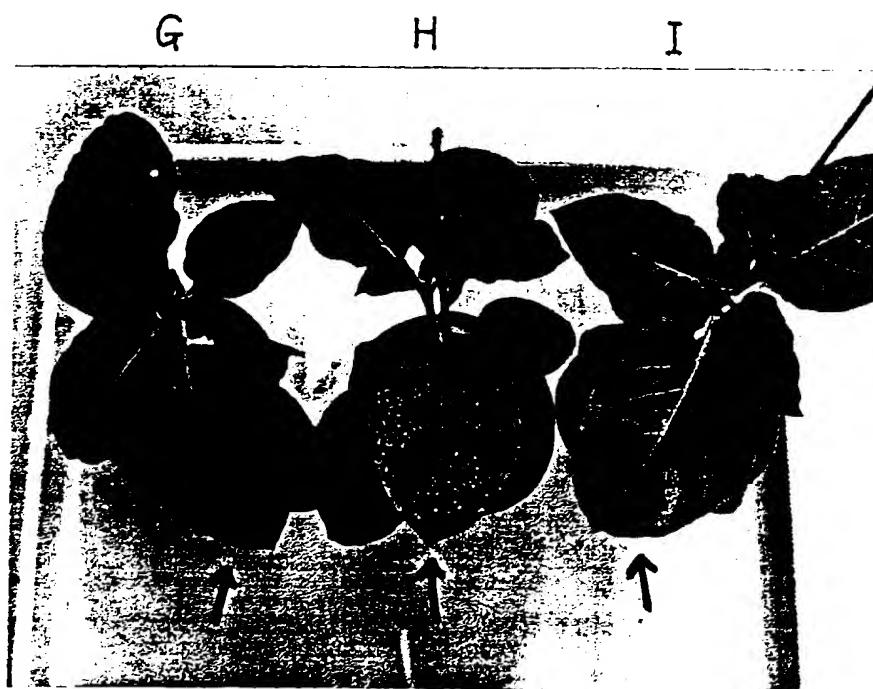
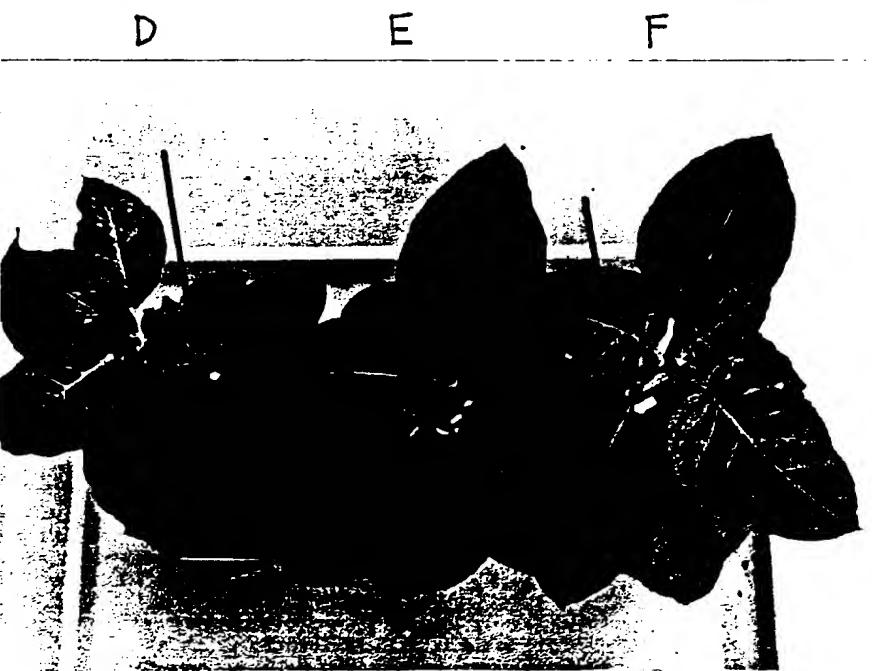
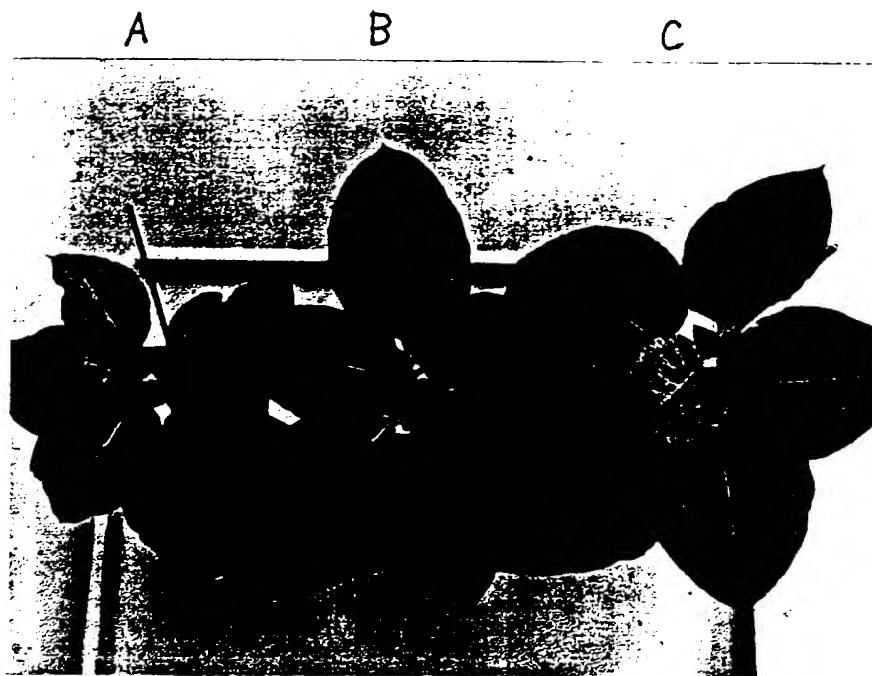


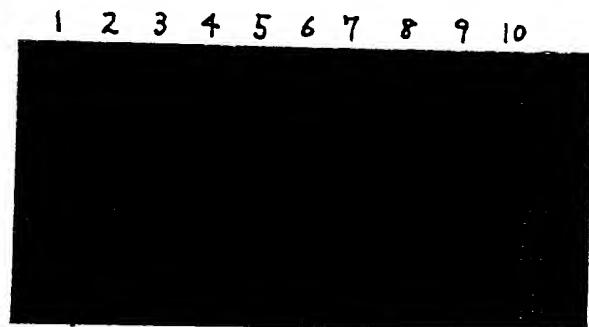
FIG. 8A



F I G . 8 B



F I G. 9



F I G. 10

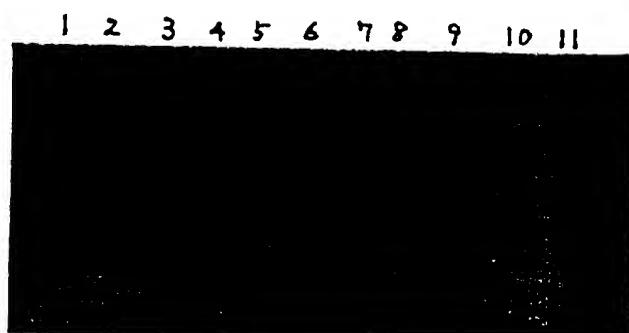


FIG. 11



F I G . 1 2

A

B

C



D

E

F

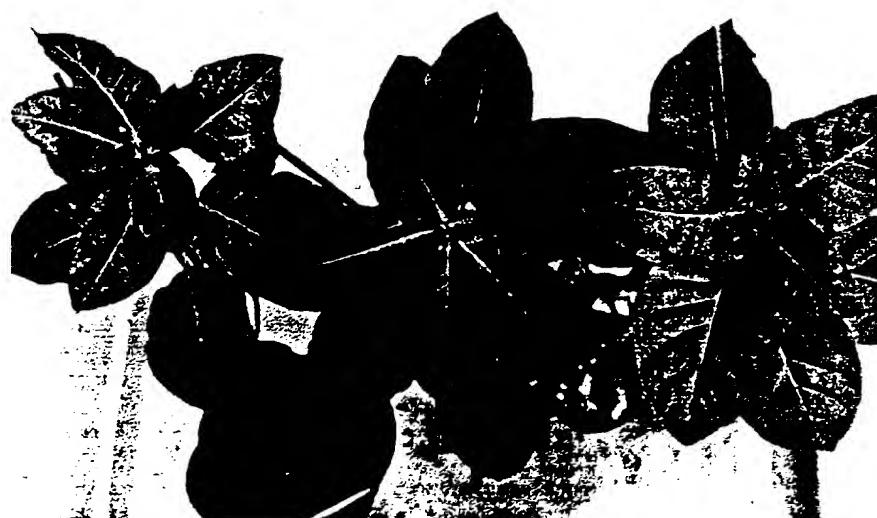
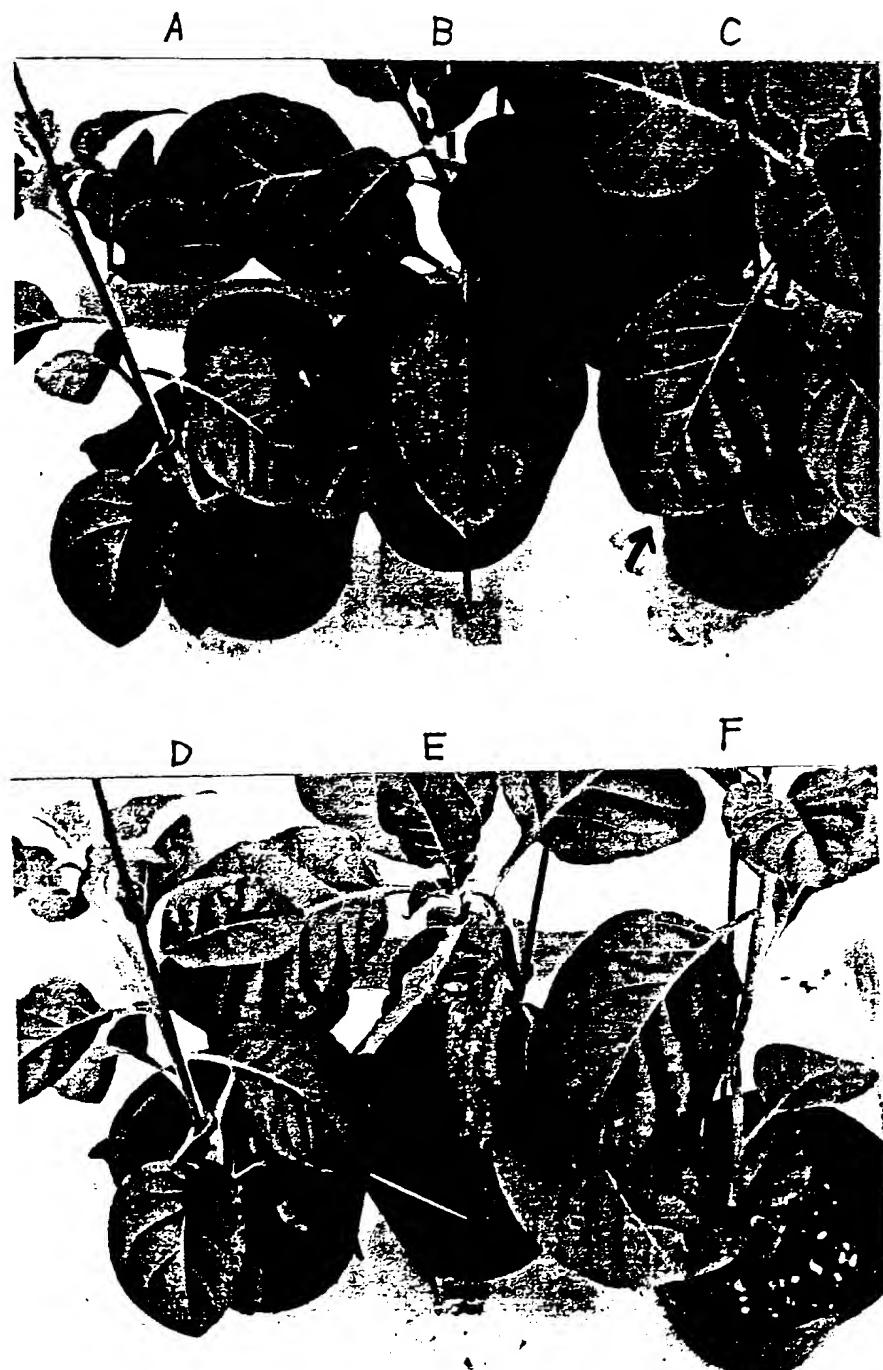
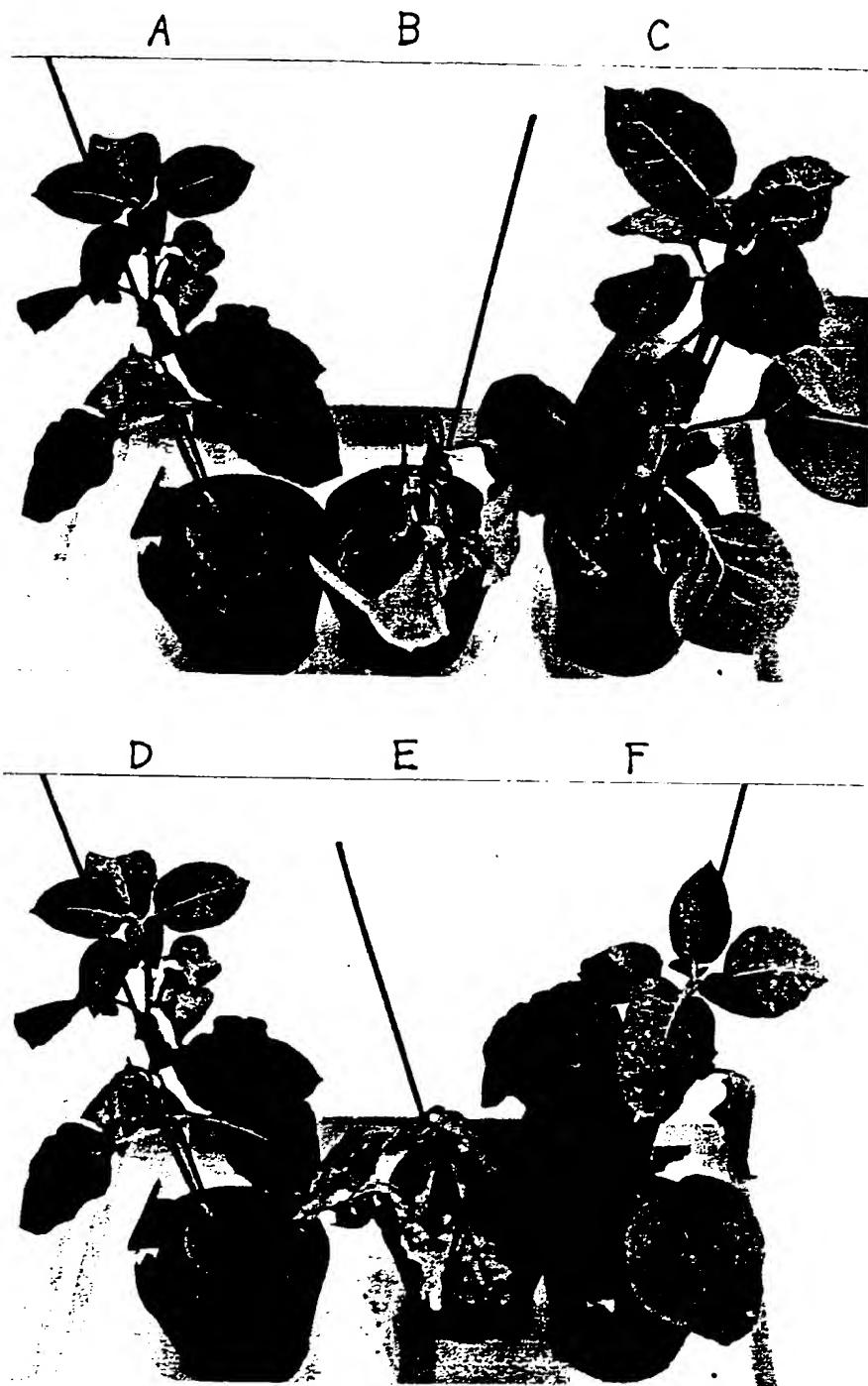


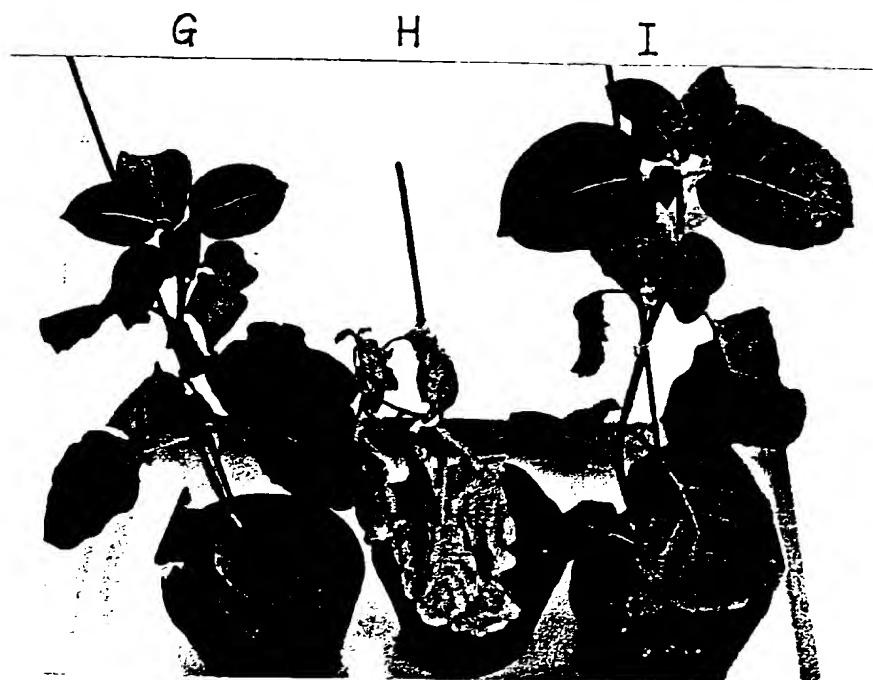
FIG. 13



F I G . 1 4 A



F I G. 1 4 B



F I G . 1 5

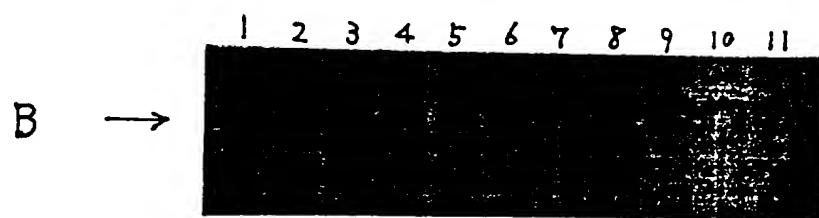
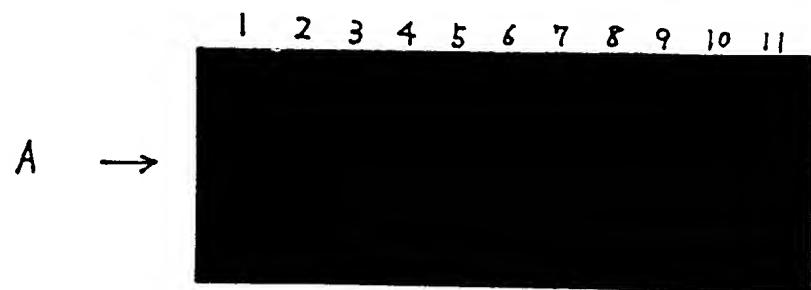


FIG. 16A

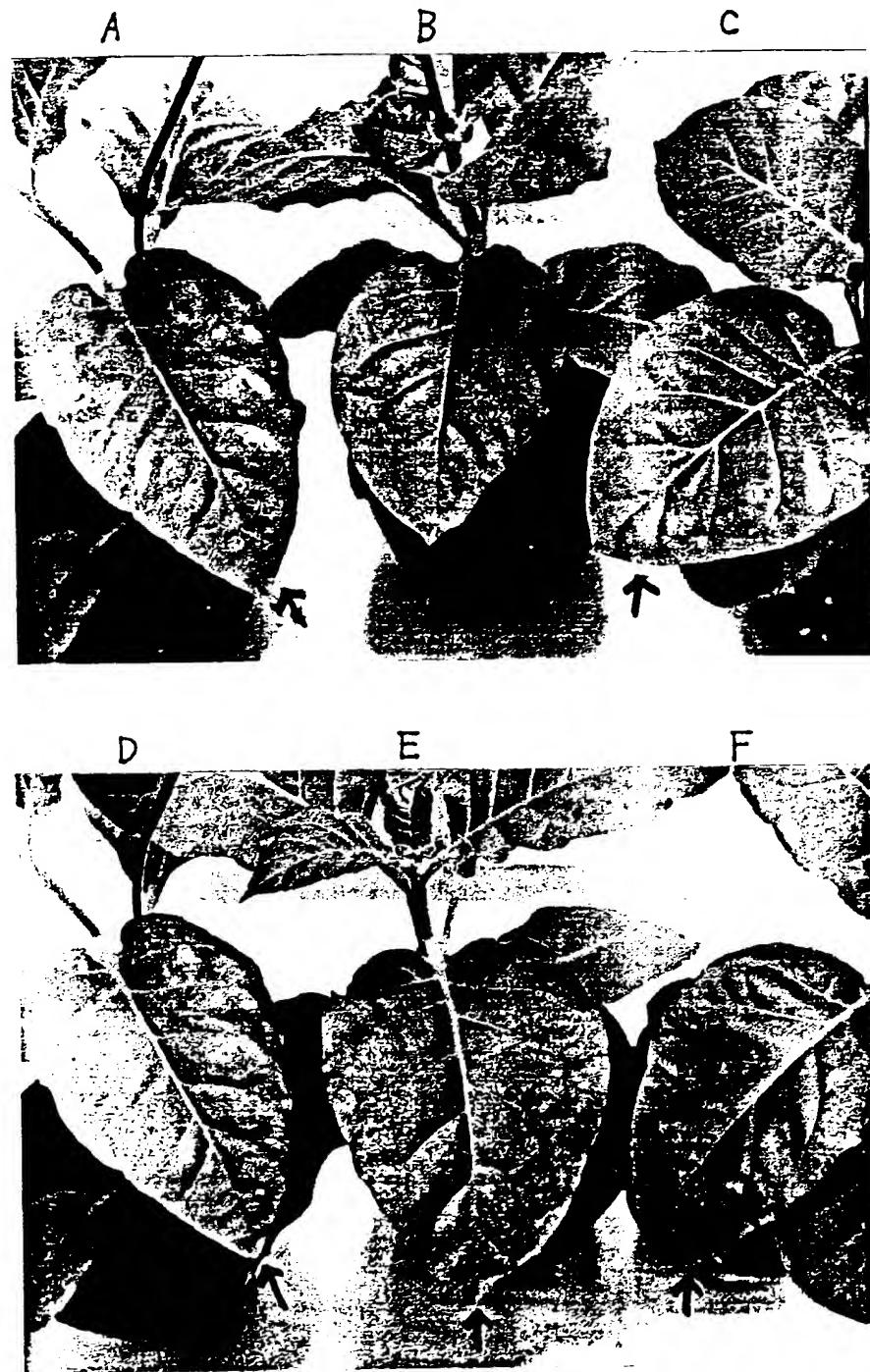


FIG. 16B

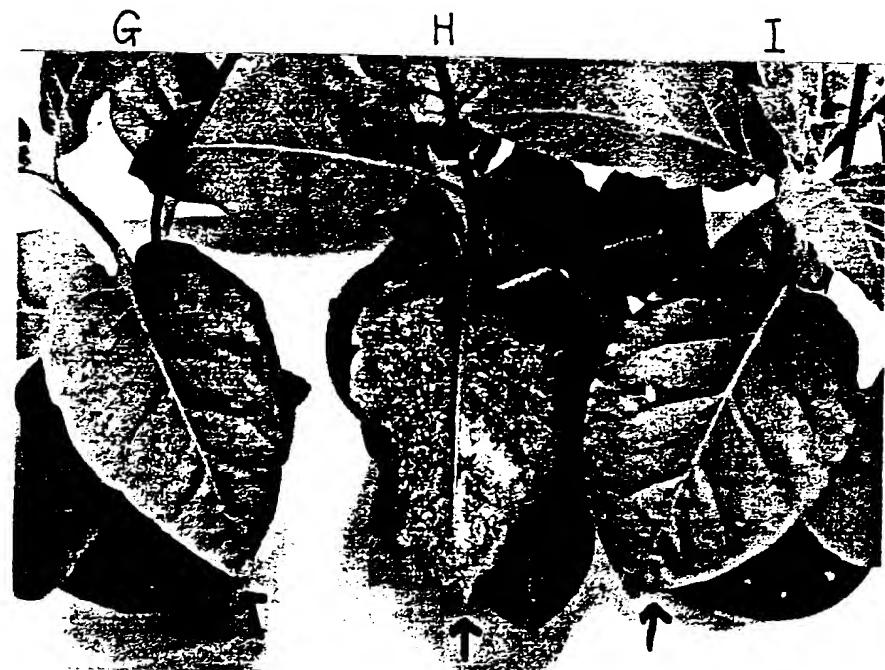
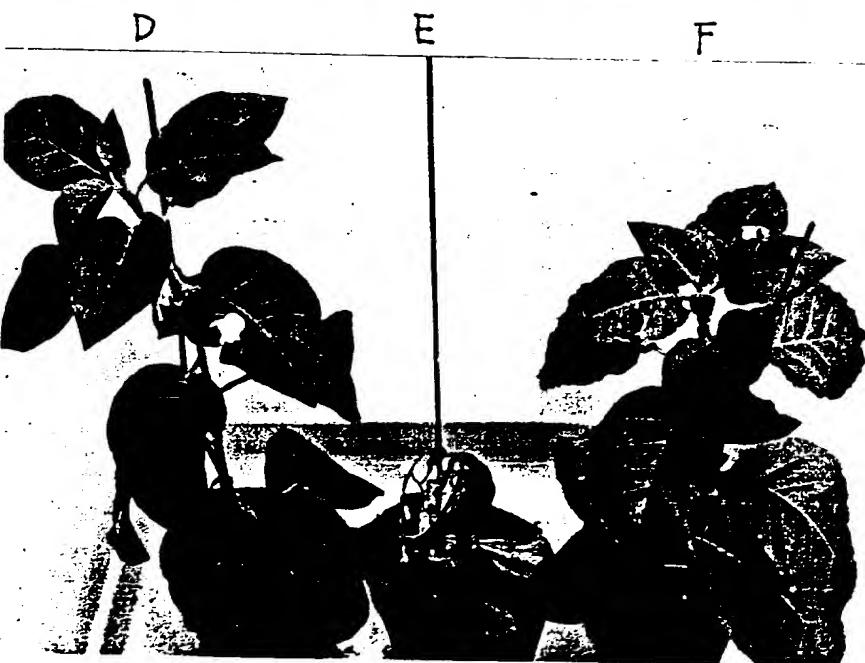
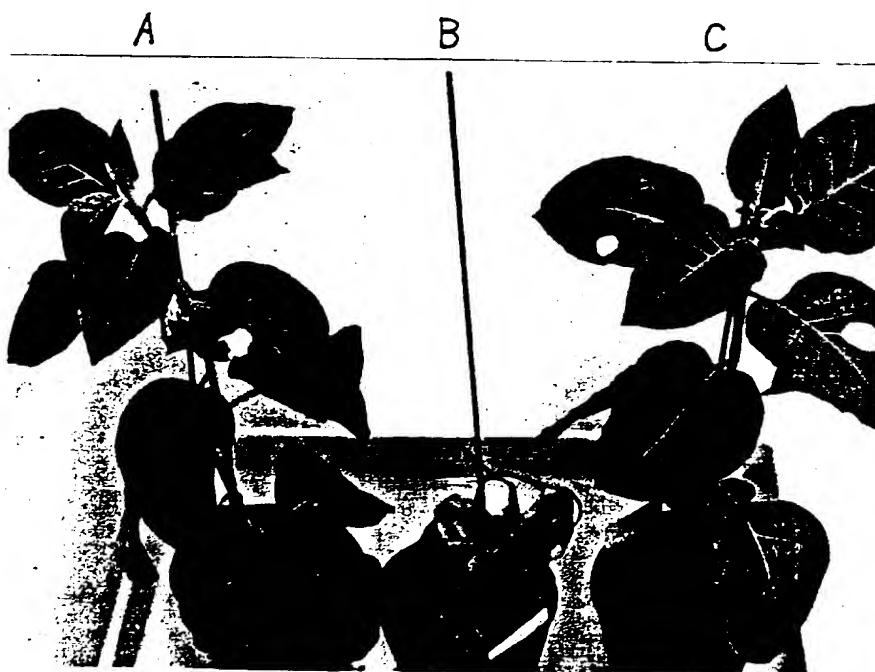


FIG. 17A



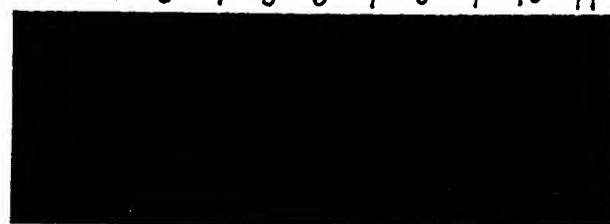
F I G . 1 7 B



F I G. 18

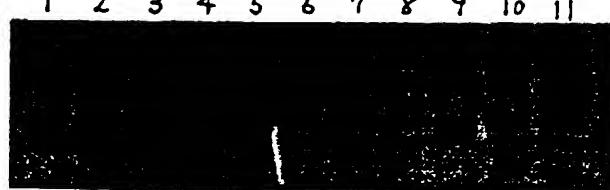
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

A →



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

B →



F I G. 1 9 A

5'	ATG	GAA	CTC	AGA	TAT	ACC	CCG	GCC	GGG	TCT	CTA	GAC	AAG	TTC	ATC	CAA	GTC	CAC
	9	18	27	36	45	54												
	M	E	L	R	Y	T	P	A	G	S	L	D	K	F	I	Q	V	H
	63	72	81	90	99	108												
	CTC	CTG	CCA	AAC	GAA	GAA	TTC	AGC	ACG	CAG	GTC	CAA	GAA	GCC	ATC	GAC	ATC	ATC
	L	L	P	N	E	E	F	S	T	Q	V	Q	E	A	I	D	I	I
	117	126	135	144	153	162												
	TGC	ACT	TTC	CTG	AAG	GAA	AAG	TGT	TTC	CGA	TGT	GCC	CCT	CAC	AGA	GTT	CGG	GTG
	C	T	F	L	K	E	K	C	F	R	C	A	P	H	R	V	R	V
	171	180	189	198	207	216												
	TCC	AAA	GTT	GTG	AAG	GGC	GGC	TCC	TCA	GGC	AAA	GGC	ACG	ACC	CTC	AGG	GGA	CGA
	S	K	V	V	K	G	G	S	S	G	K	G	T	T	L	R	G	R
	225	234	243	252	261	270												
	TCA	GAT	GCT	GAC	CTC	GTC	GTC	TTC	CTC	ACC	AAT	CTC	ACA	AGT	TTT	CAG	GAA	CAG
	S	D	A	D	L	V	V	F	L	T	N	L	T	S	F	Q	E	Q
	279	288	297	306	315	324												
	CTT	GAG	CGC	CGA	GGA	GAA	TTC	ATT	GAA	GAA	ATC	AGG	AGA	CAG	CTG	GAA	GCC	TGT
	L	E	R	R	G	E	F	I	E	E	I	R	R	Q	L	E	A	C
	333	342	351	360	369	378												
	CAA	AGA	GAG	GAA	ACA	TTT	GAA	GTG	AAG	TTT	GAG	GTC	CAG	AAA	CGG	CAA	TGG	GAG
	Q	R	E	E	T	F	E	V	K	F	E	V	Q	K	R	Q	W	E

F I G. 1 9 B

	387	396	405	414	423	432											
AAT	CCC	CGC	GCT	CTC	AGC	TTT	GTG	CTG	AGG	TCC	CCC	AAG	CTC	AAC	CAG	GCG	GTG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
N	P	R	A	L	S	F	V	L	R	S	P	K	L	N	Q	A	V
	441	450	459	468	477	486											
GAG	TTC	TAT	GTC	CTG	CCC	GCC	TTT	GAT	GCC	CTA	GGT	CAG	TTG	ACC	AAA	GGT	TAC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	F	Y	V	L	P	A	F	D	A	L	G	Q	L	T	K	G	Y
	495	504	513	522	531	540											
AGA	CCT	GAC	TCT	AGA	GTC	TAT	GTC	CGG	CTC	ATC	CAA	GAG	TGC	GAG	AAC	CTG	AGG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R	P	D	S	R	V	Y	V	R	L	I	Q	E	C	E	N	L	R
	549	558	567	576	585	594											
AGA	GAG	GGC	GAG	TTC	TCC	CCC	TGC	TTC	ACG	GAG	CTG	CAG	CGA	GAC	TTC	CTG	AAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R	E	G	E	F	S	P	C	F	T	E	L	Q	R	D	F	L	K
	603	612	621	630	639	648											
AAT	CGT	CCA	ACC	AAG	CTG	AAG	AAC	CTC	ATC	CGC	CTG	GTG	AAG	CAC	TGG	TAC	CAA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
N	R	P	T	K	L	K	N	L	I	R	L	V	K	H	W	Y	Q
	657	666	675	684	693	702											
CTG	TGT	AAG	GAG	CAG	CTT	GGA	AAG	CCA	TTG	CCC	CCA	CAA	TAT	GCT	CTG	GAG	CTT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	C	K	E	Q	L	G	K	P	L	P	P	Q	Y	A	L	E	L

F I G. 1 9 C

711	720	729	738	747	756
CTG ACG GTC TAT GCC TGG GAA CAA GGA TGC AAT AAA ACA GGA TTC ATC ACA GCT					
L T V Y A W E Q G C N K T G F I T A					
765	774	783	792	801	810
CAG GGA TTT CAG ACT GTC TTG AAA TTA GTC CTA AAG TAT CAG AAG CTT TGC ATC					
Q G F Q T V L K L V L K Y Q K L C I					
819	828	837	846	855	864
TAC TGG GAA AAG AAC TAT AAC TCT GAA AAC CCT ATT ATT GAA GAA TAT CTG ACG					
Y W E K N Y N S E N P I I E E Y L T					
873	882	891	900	909	918
AAG CAA CTT GCA AAA CCC AGG CCT GTG ATT CTG GAC CCG GCG GAC CCT ACA GGA					
K Q L A K P R P V I L D P A D P T G					
927	936	945	954	963	972
AAT GTT GCT GGT AAA GAC GCA TAT AGC TGG GAA CGG CTT GCA CGA ACG GCT TTG					
N V A G K D A Y S W E R L A R T A L					
981	990	999	1008	1017	1026
GTC TGG CTG GAT TAC CCG TGC TTT AAG AAA TGG GAT GGG TCT CCC GTG GGC TCC					
V W L D Y P C F K K W D G S P V G S					

F I G . 1 9 D

1035	1044	1053	1062	1071	1080												
TGG	GAT	GTG	TCG	CCC	CAA	GAA	CAC	AGT	GAC	CTG	ATG	TTC	CAG	GCC	TAT	GAT	TTT
W	D	V	S	P	Q	E	H	S	D	L	M	F	Q	A	Y	D	F
1089	1098	1107	1116	1125	1134												
AGA	CAG	CAC	TAT	AGA	CCC	TCT	CCA	GGA	ATC	CAG	TTC	CAC	GGA	GGA	GCC	TCT	CCC
R	Q	H	Y	R	P	S	P	G	I	Q	F	H	G	G	A	S	P
1143	1152	1161	1170														
CAG	GTG	GAA	GAG	AAC	TGG	ACA	TGT	ACC	ATC	CTC	TGA	3'					
Q	V	E	E	N	W	T	C	T	I	L	*						

F I G. 2 O A

5'	ATG	GAG	ACT	9	18	27	36	45	54									
	GAG	AGC	CAT	AAC	AAC	CCT	CAG	GAA	AGA	CCC								
	M	E	T	E	S	H	N	N	P	Q	E	R	P	T	P	S	S	N
	63	72	81	90	99	108												
	GGG	AAG	GCT	TCA	ATG	GGA	GAC	AAT	CAT	TCG	TTG	ATT	AAA	GCT	GTT	AGA	GAT	GAA
	G	K	A	S	M	G	D	N	H	S	L	I	K	A	V	R	D	E
	117	126	135	144	153	162												
	GAC	ATT	GAG	TCG	GTC	CAG	CAA	TTG	CTA	GAA	AGA	GGG	GCT	GAT	GTC	AAT	TTC	CAG
	D	I	E	S	V	Q	Q	L	L	E	R	G	A	D	V	N	F	Q
	171	180	189	198	207	216												
	GAA	GAA	TGG	GGC	TGG	TCA	CCT	TTG	CAT	AAT	GCA	GTA	CAA	GTT	GAC	AGA	GAG	GAC
	E	E	W	G	W	S	P	L	H	N	A	V	Q	V	D	R	E	D
	225	234	243	252	261	270												
	ATT	GTC	GAA	CTT	CTG	CTT	AGT	CAT	GGT	GCT	GAG	CCT	TGT	CTG	CGG	AAG	AAG	AAT
	I	V	E	L	L	L	S	H	G	A	E	P	C	L	R	K	K	N
	279	288	297	306	315	324												
	GGG	GCC	ACT	CCC	TTC	ATC	ATT	GCT	GGG	ATT	GTC	GGA	AAC	GTC	AAG	TTG	CTC	AAA
	G	A	T	P	F	I	I	A	G	I	V	G	N	V	K	L	L	K
	333	342	351	360	369	378												
	CTA	TTA	CTT	CCT	AAA	GTA	ACA	GAT	GTC	AAT	GAG	TGT	GAT	GTC	AAT	GGC	TTC	ACA
	L	L	L	P	K	V	T	D	V	N	E	C	D	V	N	G	F	T

F I G . 2 O B

GCT	TTC	ATG	GAA	GCT	387	396	405	414	423	432
A	F	M	E	A	A	V	Y	G	K	V
AAC	AAC	GGA	GCA	GAG	441	450	459	468	477	486
N	N	G	A	E	V	N	L	H	R	K
GTT	AAG	AAA	CGA	GGG	495	504	513	522	531	540
V	K	K	G	G	A	T	A	L	M	D
GAT	GTC	GTA	GAG	ATC	549	558	567	576	585	594
D	V	V	E	I	603	612	621	630	639	648
AAT	AGG	GGC	AGA	AAT	GCT	TTA	ATC	TAT	GAT	GAT
N	R	G	R	N	657	666	675	684	693	702
GTG	AAA	GTG	AAA	GCN	ACT	ACT	CGC	CTT	CTG	GTC
V	K	V	K	A	T	T	R	L	L	AAT
					D	Y	K	V	D	V
										N

F I G. 2 O C

GTG	AGG	711	GGG	GAA	720	AAG	ACG	CCG	CTG	ATC	TTG	GCA	GTG	GAA	AAG	AAG	AAC			
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
V	R	G	E	G	R	K	T	P	L	I	L	A	V	E	K	K	N			
CTG	GAT	765	CTG	GTG	774	CAG	ATG	CTT	CTG	GAA	CAA	ACA	GCT	ATA	GAG	ATT	AAT	GAC	ACA	
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
L	D	L	V	Q	M	L	L	E	Q	T	A	I	E	I	N	D	T			
GAC	AGT	819	GAG	GGT	828	AAA	ACA	GCA	CTG	CTG	CTT	GCT	846	GTC	GAG	CTC	AAG	CTG	AAG	GAA
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
D	S	E	G	K	T	A	L	L	L	A	V	E	L	K	L	K	E			
ATT	GCC	873	CAG	TTG	882	CTG	TGT	CGC	AAA	GGA	GCC	AGC	900	ACA	AAA	TGC	GGG	GAC	CTC	GTC
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
I	A	Q	L	L	C	R	K	G	A	S	T	K	C	G	D	L	V			
GCA	ATA	927	GCG	AAG	936	CGC	AAT	TAT	GAC	TCT	GAC	945	CTT	GCA	AAG	TTC	CTT	CGC	CAG	CAT
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A	I	A	K	R	N	Y	D	S	D	L	A	K	F	L	R	Q	H			
GGA	GCT	981	GTA	GAA	990	GAC	GTT	TGC	CCT	CCT	GCT	999	1008	GCC	TGG	AAG	CCT	CAG	AGC	TCA
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
G	A	V	E	D	V	C	P	P	A	K	A	W	K	P	Q	S	S			
CGT	TGG	1035	GGG	GAG	1044	GCC	CTG	AAA	CAT	CTT	CAC	1053	AGG	ATA	TAC	CGC	CCT	ATG	ATA	GGC
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
R	W	G	E	A	L	K	H	L	H	R	I	Y	R	P	M	I	G			

F I G. 2 O D

1089	1098	1107	1116	1125	1134
AAA CTC AAG ATC TTT ATT GAT GAA GAA	TAT AAA ATC GCT GAC ACT TCC CAA GGG				
K L K I F I D E E Y K I A D T S Q G					
1143	1152	1161	1170	1179	1188
GGC ATC TAC CTG GGG TTA TAT GAG GAA CAA GAG GTA GCT GTG AAG CGG TTC CCT					
G I Y L G L Y E E Q E V A V K R F P					
1197	1206	1215	1224	1233	1242
AAA GGC AGC ACA CGG GGA CAA AAT GAA GTC TCT TGT TTG CAG AGC AAC CGA GCC					
K G S T R G Q N E V S C L Q S N R A					
1251	1260	1269	1278	1287	1296
AAT GGT CAC GTG GTG ACG TTC TAT GGC AGT GAG AGC GAC AGG ACC TGT CTG TAT					
N G H V V T F Y G S E S D R T C L Y					
1305	1314	1323	1332	1341	1350
GTG TGC CTT GCC CTG TGT GAG CAC ACG CTG GAG AAG CAC TTG GAC GAC CGC AAA					
V C L A L C E H T L E K H L D D R K					
1359	1368	1377	1386	1395	1404
GGA GAG GCT GTG CAA AAC AAG GAA GAT GAA TTT GCC CGC AAC ATC CTC TCA TCT					
G E A V Q N K E D E F A R N I L S S					
1413	1422	1431	1440	1449	1458
CTG TTT AAG GCT GTT GAG GAA CTA CAC CGG TCT GGA TAC ACT CAT CAG GAT CTG					
L F K A V E E L H R S G Y T H Q D L					

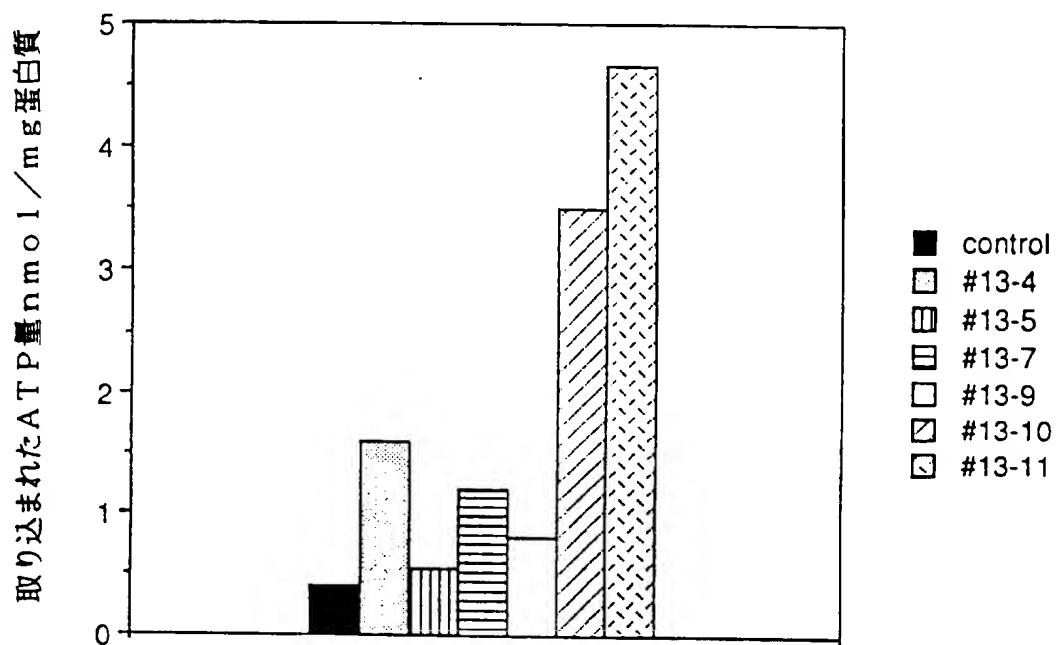
F I G . 2 O E

1467	1476	1485	1494	1503	1512
CAA CCG CAG AAC ATC TTA ATA GAT TCC	AAG AAT GGT GCT TGC CTG	GCA GAT TTT			
Q P Q N I L I D S K N G A C L A D F					
1521	1530	1539	1548	1557	1566
GAT AAA AGC GTC AAG GGG ACT GGA GAT CCA CAG GAA ATC AAG AGA GAT CTA GAG					
D K S V K G T G D P Q E I K R D L E					
1575	1584	1593	1602	1611	1620
GCC CTG GGA CTG CTG GTC CTA TAT GTG GTA AAA AAG GGA AAT GAT TCT TTT GAG					
A L G L L V L Y V V K K G N D S F E					
1629	1638	1647	1656	1665	1674
ATG CTG AAG AAT CTA AGA ACT GAA GAG TTG ATT GAG CGT TCT CCA GAT AAG GAA					
M L K N L R T E E L I E R S P D K E					
1683	1692	1701	1710	1719	1728
ACT CGG GAC CTC ATT CGG CAT CTG TTA GTC CCT GGG GAC AAT GTG AAG GGC CAT					
T R D L I R H L L V P G D N V K G H					
1737	1746	1755	1764	1773	1782
CTG AGT GGC CTG CTG GCT CAT CCC TTC TTT TGG AGT TGG GAG AGC CGC TAC CGG					
L S G L L A H P F F W S W E S R Y R					
1791	1800	1809	1818	1827	1836
ACC CTA CGG GAT GTG GGA AAC GAA TCT GAC ATC AAA ACA CGA AAT ACT AAT GGC					
T L R D V G N E S D I K T R N T N G					

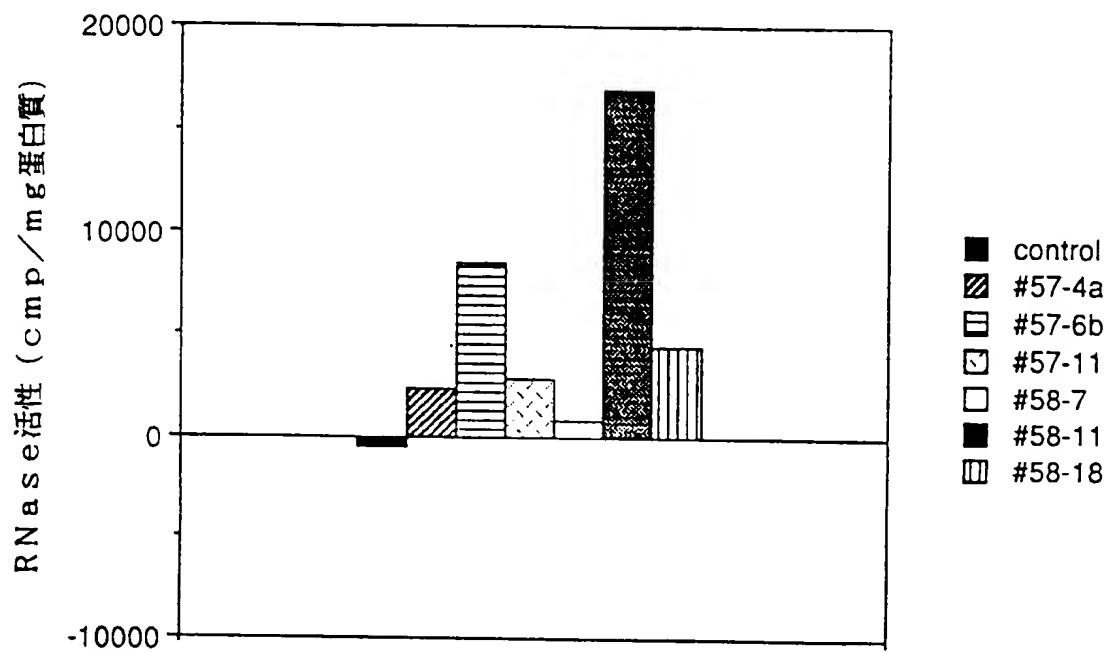
F I G. 2 O F

1845	1854	1863	1872	1881	1890
AAG ATC CTC CAG CTT CTG CAA CCT GAA ACA TCT GAA CTT CCA AGT TTT GCC CAG					
---	---	---	---	---	---
K I L Q L L Q P E T S E L P S F A Q					
1899	1908	1917	1926	1935	1944
TGG ACA ATT GAG GTT GAC AAA TCT GTG ATG AAA AAA ATG AAT ACC TAT CAG AAC					
---	---	---	---	---	---
W T I E V D K S V M K K M N T Y Q N					
1953	1962	1971	1980	1989	1998
ACT GTA GGT GAC CTG CTG AAG TTC ATC CGG AAT GTG GGA GAG CAC ATT AAT GAA					
---	---	---	---	---	---
T V G D L L K F I R N V G E H I N E					
2007	2016	2025	2034	2043	2052
CAA AAG AAT ATA GAG ATG AAG TCA AAA ATT GGA GAA CCT TCC CAG TAT TTT CAG					
---	---	---	---	---	---
Q K N I E M K S K I G E P S Q Y F Q					
2061	2070	2079	2088	2097	2106
GAG AAA TTT CCA GAT CTG GTC ATG TAT GTC TAT AAA AGA CTA CAG AAC ACA GAA					
---	---	---	---	---	---
E K F P D L V M Y V Y K R L Q N T E					
2115	2124	2133	2142	2151	
TAT GCA AAG CAT TTT CCA AAA AAT CTC AAC CTG AAC AAA CCC GAC GTG TGA 3'					
---	---	---	---	---	---
Y A K H F P K N L N L N K P D V *					

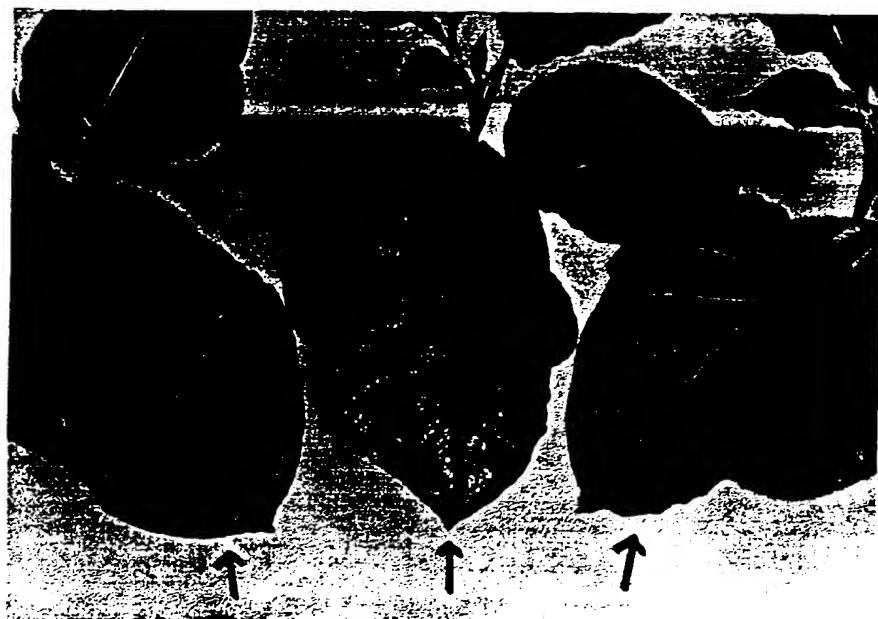
F I G . 2 1



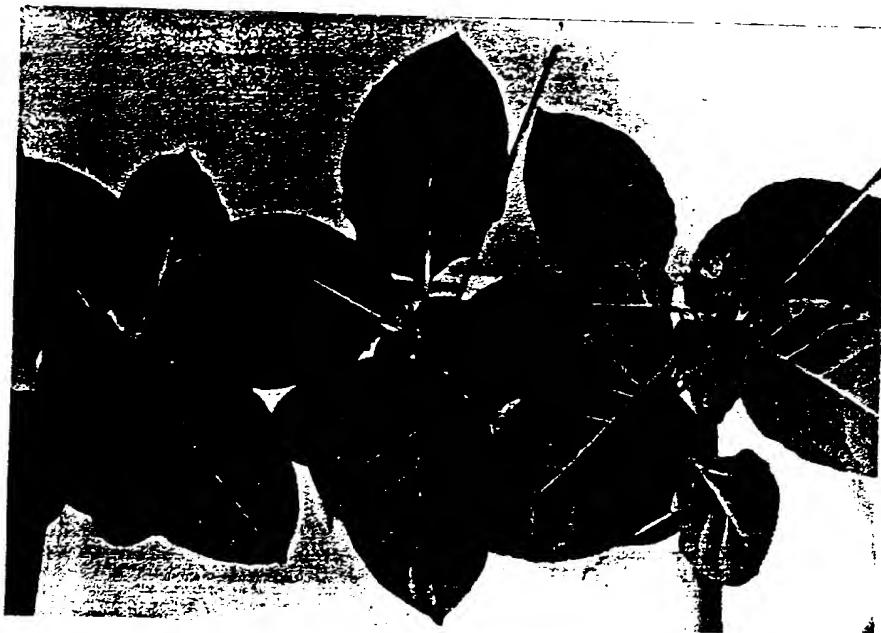
F I G. 22



F I G. 23



F I G . 2 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01485

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ A01H5/00, A01H1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST File on Science and Technology
BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 93/20686, A1 (Kirin Brewery Company, Ltd.), May 28, 1993 (28. 05. 93) & EP, 592685, A1 & US, 5491080, A	1 - 9
Y	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 264, No. 10, 1989, Schroder H. C., Wenger R., Kuchino Y., Muller W. E. G., p. 5669-5673	1 - 9
	"Biochemistry Encyclopedia" (2nd edit.), By Tokyo Kagaku Dojin, November 22, 1990 (22. 11. 90), p. 236, Section of (2'-5')oligoadenylate	
Y	p. 1423, Section of ribonuclease L	1 - 9
		1 - 9

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

• Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
August 9, 1996 (09. 08. 96)

Date of mailing of the international search report

August 27, 1996 (27. 08. 96)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP96/01485

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' A01H5/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' A01H5/00, Int. C1' A01H1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST 科学技術文献ファイル、
BIOSIS PREVIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 93/20686, A1 (麒麟麦酒株式会社) 28. 5月. 1993 (28. 05. 93) &EP, 592685, A1 & US, 5491080, A	1-9
Y	The Journal of Biological Chemistry, volume 264, no.10, 1989. Schroder H.C., Wenger R., Kuchino Y., Muller W.E.G. p.5669-5673	1-9
Y	「生化学事典」(第2版), 東京化学同人発行, 22. 11月. 1990 (22. 11. 90) p. 236. (2'-5')オリゴアデニル酸 ((2'-5')oligoadenylate) の欄 p. 1423. リボヌクレアーゼL (ribonuclease L) の欄	1-9
Y		1-9

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 08. 96

国際調査報告の発送日

27.08.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

三井
郡山 順

2B | 9414

電話番号 03-3581-1101 内線 3238